

**Untersuchungen zur Differenzierung der Isoenzyme
der alkalischen Phosphatase im Serum**

Günther Lehmeier

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Klinisch-Chemischen Institut des Städt. Krankenhauses
München-Schwabing

Direktor: Prof. Dr. med. Otto Wieland

Untersuchungen zur Differenzierung der Isoenzyme der
alkalischen Phosphatase im Serum.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Günther Lehmeier

aus
Amberg

Jahr
1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. O. Wieland

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Fritz

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.1976



DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

I N H A L T

1. Einleitung
2. Versuch der Isoenzymbestimmung der AP im menschlichen Serum nach der Methode von Ohlen (60)
 - 2.1. Material und Methoden
 - 2.2. Ergebnisse
 - 2.3. Diskussion
3. Versuch der AP-Isoenzym-Bestimmung aus menschlichem Serum und Gewebe durch elektro-phoretische Auftrennung auf Zellulose-Acetat-Träger nach Fritsche (28) und Rhone (64-66)
 - 3.1. Material und Methoden
 - 3.2. Ergebnisse
 - 3.3. Diskussion
4. Präparation der AP aus Menschenleber
 - 4.1. Material und Methoden
 - 4.2. Reinigungsgang und Ergebnisse
 - 4.2.1. Butanol-Extraktion
 - 4.2.2. Ammoniumsulfatfällung
 - 4.2.3. Säulenchromatographie
 - 4.2.4. Gelfiltration
 - 4.2.5. Vergleich und Zusammenfassung
 - 4.3. Diskussion
5. Versuche zur immunologischen Differenzierung der AP des Menschen aus Leber und Knochen
 - 5.1. Material und Methoden
 - 5.2. Ergebnisse
 - 5.2.1. Agargel-Präzipitation nach 1. Blutentnahme
 - 5.2.2. Agargel-Präzipitation nach 2. Blutentnahme
 - 5.2.3. Immuntitrationsversuche

5.3. Diskussion

6. Zusammenfassung

7. Literatur

A B K Ü R Z U N G E N :

AG	Antigen
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mU	Milliunit
nm	Nanometer
sec	Sekunde
U	Unit
µm	Mikrometer

1. EINLEITUNG

Die alkalischen Phosphatasen (orthophosphoric monoester phosphohydrolase, E.C. 3.1.3.1.) bilden eine Gruppe von Enzymen, die die Hydrolyse von Phosphateestern bei alkalischem pH katalysieren. Die spezifischen biochemischen Funktionen der alkalischen Phosphatasen im menschlichen Stoffwechsel und ihr struktureller Aufbau sind zum großen Teil noch nicht klar (42). Alkalische Phosphatase findet sich in hoher Konzentration im wachsenden Knochen und im Gallesekret. Sie wurde außerdem nachgewiesen in Plazenta, Dünndarm, Leukozyten und in Karzinomen (24). Bekannt ist ferner, daß die im Serum bestimmte AP nicht einem, sondern verschiedenen Organen entstammt. Die Blutkonzentration spiegelt die Phosphataseaktivität des wachsenden oder in Reparation befindlichen Knochens wider. Bei Leber - Gallengangsverschlüssen steigt die Blutkonzentration an.

Die Bestimmung der AP-Aktivität im menschlichen Serum (mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat) gehört zu den Routineuntersuchungen in der klinischen Chemie und liefert bei einer Vielzahl von Krankheitsbildern einen wertvollen Beitrag zur Diagnosestellung. So findet sich eine Erhöhung bei: Kindern (Knochenwachstum);

Osteoplastischen Knochenprozessen, Hyperparathyreoidismus, Rachitis, Osteomalazie, Knochentumoren (Osteosarkom, Knochenmetastasen, Myelom), M. Paget (Ostitis deformans), Sarkoidose;

Von Stein, Striktur oder Neoplasma verursachten Leber- und Gallengangsverschlüssen;

Medikamentös bedingten Lebererkrankungen, z.B. nach Chlorpromazin, Methyltestosteron;

Eine Verminderung tritt auf bei Hypoparathyreoidismus und verlangsamtem Wachstum bei Kindern.

Es stellt sich daher die Frage: Sind die alkalischen Phosphatasen aus den verschiedenen Organen miteinander identisch und nicht nach ihrer Organherkunft zu differenzieren, oder bilden sie wie z.B. die LDH ein Isoenzymmuster im Serum mit der Möglichkeit, sie nach ihrem Ursprungsort zu differenzieren. Zur Klärung dieser Frage stehen folgende Untersuchungsmethoden zur Verfügung: elektrophoretische Auftrennung, chemische und physikalische Hemmung bzw. Inaktivierung, Reinigung der AP aus den verschiedenen Organen zur Klärung ihrer enzymchemischen Eigenschaften und zur Herstellung von Antikörpern mit dem Ziel der immunologischen Differenzierung.

Die vorliegenden Ergebnisse der auf diesem Gebiet durchgeführten Untersuchungen lassen als gesichert gelten, daß es sich um Isoenzyme handelt. Trotz vieler angegebener Methoden der Isoenzymbestimmung und organspezifischen Differenzierung (11,12,17,19,22,23,28,29,31,34,39,42,44,74) ist es noch nicht möglich, eine einheitliche Vorstellung über die Zusammensetzung der AP im Serum zu entwickeln und die Isoenzymbestimmung in die klinische Routinediagnostik aufzunehmen.

Die der menschlichen Plazenta entstammende AP wurde bisher am eingehendsten untersucht. Nach Donald Harkness (32,33) läßt sie sich als farbloses, nadelförmiges Kristall, 1 mal 20 μm groß, auskristallisieren. Sie stellt eine unspezifische Phosphatase dar mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 125 000, reaktivierbar durch Zn^{++} und Co^{++} . Nach Sussmans Untersuchungen (78) handelt es sich im alkalischen pH-Bereich um ein Dimer mit einem Molekulargewicht von ca 116 000, wobei die Untereinheiten gleiches Molekulargewicht und dieselbe elektrophoretische Mobilität besitzen. Sie verhält sich antigenetisch unterschiedlich gegenüber AP-Präparationen aus anderen menschlichen Organen wie Leber, Knochen und neutrophilen Granulozyten. Die AP aus menschlichem Leber- oder Knochengewebe in Kristall-

form darzustellen ist bisher noch nicht gelungen.

Von klinischem Interesse ist die Beantwortung der Frage der Differenzierung zwischen Leber-, Knochen- und gegebenenfalls eventueller Tumorphosphatase durch eine zuverlässige Methode. Um der Lösung dieses Problems näher zu kommen, wurden u.a. folgende Untersuchungen vorgenommen:

1. Von Ohlen et al.(60) wird eine physikalisch-chemische Differenzierung beschrieben. In einem ersten Schritt wird die AP aus dem Dünndarm durch Zusatz von L-Phenylalanin gehemmt (21), in einem zweiten Schritt soll durch Hitzeinaktivierung die AP des Knochens aus dem Serum eliminiert werden. Aus den so erhaltenen Werten werden Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der AP im Serum gezogen.
2. Zahlreiche Versuche gelten der elektrophoretischen Auftrennung auf Cellulose-Acetat oder Polyacrylamidgel (11,28, 39,64-66). Durch Vergleich mit AP-Extrakten aus Leber und Knochen sollen die aus Seren erhaltenen Banden identifiziert werden.
3. Die immunologische Differenzierung zwischen Leber- und Knochen-AP mit monospezifischen Antikörpern wird ebenfalls versucht, doch liegen noch keine nennbaren Veröffentlichungen vor. Sussmans Antikörper gegen die Plazenta-AP (77) bewirken keine Präzipitation und keinen Aktivitätsverlust. Sie reagieren nicht mit AP-Extrakten aus Leber und Knochen. Zugang zur routinemäßigen Isoenzymbestimmung der AP hat bisher jedoch noch keine der geschilderten Methoden gefunden.

In dieser Arbeit soll versucht werden, eine für das klinisch-chemische Routinelabor brauchbare Methode der Isoenzymdifferenzierung Knochen - Leber zu finden. Zu diesem Zweck werden die in 1 und 2 genannten Methoden auf ihre Aussagekraft hin geprüft. Weiterhin soll die Frage untersucht werden, ob sich die AP aus der Leber immunologisch von der AP aus dem Knochen differenzieren läßt. Zu diesem

Zweck wird die AP aus Lebergewebe extrahiert und hoch gereinigt, um sie als Antigen verwenden zu können. Da die Reinigung des Isoenzym im Hinblick auf die Immunisierung erfolgt, wird auf eine Enzymcharakterisierung verzichtet.

Versuch der I S O E N Z Y M - Bestimmung der alkalischen Phosphatase im menschlichen Serum nach der M E T H O D E von O H L E N (60)

1. Material und Methoden

Die Bestimmung der AP-Aktivität im Serum erfolgte als optischer Test nach der Methode von Bessey (6). Hierbei wird das Substrat p-Nitrophenylphosphat verwendet, das durch die Enzymwirkung in p-Nitrophenol und Phosphorsäure gespalten wird. Durch Zugabe von Natronlauge wird die Reaktion unterbrochen. Das freigesetzte p-Nitrophenol liegt als gelb gefärbtes Anion vor, das photometrisch bei 405 nm bestimmt werden kann. Die Menge des in der Zeiteinheit freigesetzten p-Nitrophenols ist der Phosphataseaktivität direkt proportional.

Die Reagenzlösung (Boehringer Mannheim) enthält 5,5 mM Natrium-p-Nitrophenylphosphat (Substrat) in 50 mM Glycinpuffer pH=10,5 und 0,5 mM $MgCl_2$. Für jede Probe ist ein Leerwert nötig. 1,0 ml Reagenzlösung (Leerwert) und 0,1 ml Serum in 1,0 ml Reagenzlösung (Probe) werden bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Genau nach 30 min wird die Reaktion durch Zugabe von je 10 ml 0.02 N Natronlauge gestoppt, anschließend dem Leerwert 0,1 ml Serum hinzugefügt. Leerwert und Probe werden in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke gegossen und im Eppendorf-Photometer die Extinktion der Probe gegen den Leerwert (Null-Punkt) bei 405 nm Wellenlänge gemessen. Die Berechnung der Volumenaktivität (mU/ml) erfolgt nach der Formel:
$$\frac{E \cdot V \cdot 1000}{\epsilon \cdot d \cdot v \cdot t} = 200 \cdot E$$
 wobei V = Gesamtvolumen, v = Serumvolumen, t = Inkubationszeit, ϵ = Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol bei 405 nm = 18,5 (cm²/uMol), E = Extinktion der Probe und d = Schichtdicke der Küvette bedeuten. Die Normalwerte liegen beim Erwachsenen zwischen 20 und 48 mU/ml .

Die Bestimmung des Q-Wertes erfolgte nach der von Onley (58) angegebenen Methode in zwei Schritten. In einem ersten Schritt wurde die AP-Aktivität der Serumprobe nach Zusatz von 5 mM L-Phenylalanin (Merck) bestimmt. Diese Probe wurde im zweiten Schritt genau 15 min in einem Wasserbad von 56° C inkubiert, anschließend sofort auf 0°C abgekühlt und erneut die AP-Aktivität bestimmt.

Der erste Schritt war die Messung der Minderalkalosphatase zum Zweck, der zweite Schritt die Inaktivierung der Knochen-Phosphatase.

Der Q-Wert ist definiert als:
$$\frac{\text{AP-Aktivität nach Schritt 2} \cdot 100}{\text{AP-Aktivität nach Schritt 1}}$$

in Worten: "...Verhältnis zwischen hitzelabiler Knochenphosphatase und relativ hitzestabilen Leber-Gallengangs-Phosphatasen" (60).

Interpretation des Q-Wertes: Werte zwischen 10,0 und 11,3 bilden den Normalbereich, Werte zwischen 6,6 und 11,4 streichen für vermehrt Knochenphosphatase im Serum, während Werte zwischen 23,7 und 49,9 für vermehrt Leber-Gallengangs-Phosphatasen sprechen.

2.2. Ergebnisse

Auf die geschilderte Weise wurde der Q-Wert von 25 Seren mit erhöhter AP-Aktivität bestimmt. Sie stammten von Patienten (männlich und weiblich) mit Leber- oder Knochen-erkrankungen. Q-Wert und Diagnose wurden miteinander verglichen. Das Ergebnis zeigt Tabelle A. Die Spalte "AP" gibt die AP-Aktivität des Serums in mU/ml an. In der Spalte "Interpretation" ist die Zugehörigkeit des Q-Wertes zu den Bereichen n = Normalbereich, K = Knochenphosphatase erhöht und L = Leber-Gallengangs-Phosphatasen erhöht durch einen Punkt gekennzeichnet. In der Spalte "Vergleich" wird zwischen Diagnose und Q-Wert-Interpretation verglichen, wobei + = Übereinstimmung und - = keine Übereinstimmung bedeutet.

Tab. A: Korrelation zwischen Diagnose und Q-Wert
Interpretation (Erläuterung im Text)

Nr	Diagnose	AP	Q-Wert	Interpretation			Vergleich
				n	K	L	
1	Knochenmetastasen	458	0,2		.		+
2	Knochenmetastasen	60	3,8		.		+
3	Knochenmetastasen	126	3,7		.		+
4	Knochenmetastasen	50	2,8		.		+
5	Knochenmetastasen	134	8,1		.		+
6	Knochenmetastasen	166	0,3		.		+
7	Hepatitis	93	8,4		.		-
8	Hepatitis	115	12,8	.			-
9	Hepatitis	72	16,1	.			-
10	Hepatitis	106	12,9	.			-
11	Hepatitis	94	9,1		.		-
12	Hepatitis	82	10,7		.		-
13	Lebermetastasen	75	15,8	.			-
14	Lebermetastasen	145	25,6			.	+
15	Lebermetastasen	222	29,2			.	+
16	Leberzirrhose	101	4,5		.		-
17	Leberzirrhose	67	2,0		.		-
18	Leberzirrhose	64	9,3		.		-
19	Verschlußikterus	177	17,5	.			-
20	Verschlußikterus	131	20,1	.			-
21	Cholelithiasis	179	12,8	.			-
22	Cholelithiasis	63	11,7	.			-
23	Cholezystitis	117	20,0	.			-
24	Cholezystitis	128	14,8	.			-
25	Gallenblasen-Ca	383	19,8	.			-

Q-Wert bei Knochenerkrankungen:

Bei den Knochenerkrankungen handelte es sich um Tumorelastasen im Knochengewebe. Bis auf eine Ausnahme sank der Q-Wert unter den von Ohlen angegebenen Grenzwert von 5,6. Die Q-Wert-Interpretation (Zunahme der Knochentrophatase im Serum) stimmte somit in allen 4 Fällen mit der Diagnose überein.

Q-Wert bei Lebererkrankungen:

In 2 Fällen sprach der Q-Wert für eine Vermehrung der Leber-Gallengangs-Phosphatasen, in 11 Fällen für eine normale Verteilung der AP und in 4 Fällen für einen Anstieg der AP aus dem Knochen. Der Q-Wert deutete also nur in 11% der Fälle auf einen Anstieg des hepatogenen AP-Anteils hin, während 63% der Q-Werte für eine Zunahme des skeletogenen AP-Anteils sprachen.

Auf die 25 untersuchten Fälle bezogen, stand die Q-Wert Interpretation in 68% der Fälle im Widerspruch zur Diagnose, falls nicht die Werte im Normalbereich durch eine gleichzeitige Erhöhung der Leber- und Knochen-AP erklärt werden sollen, wofür kein Anhaltspunkt bestand. Alle der Q-Werte deuteten auf den auch klinisch vermuteten Ort vermehrter AP-Synthese hin.

2. Diskussion

Das geschilderte Verfahren zur Unterscheidung der AP-Isoenzyme aus Leber und Knochen beruht auf der Annahme, daß die beiden Isoenzyme verschiedene Temperaturempfindlichkeit besitzen. Nach Angaben verschiedener Autoren (4,19, 60,85) wird die Knochentrophatase durch Temperaturerhöhung auf 56°C schneller inaktiviert als das Isoenzym der Leber. Mit diesen Angaben decken sich auch die Ergebnisse aus unseren Versuchen. Die Serien der Patienten mit

Knochenerkrankungen zeigen nach 15-minütiger Inkubation bei 56°C einen AP-Aktivitätsverlust zwischen 91,9% und 99,8% , während der Aktivitätsverlust der Seren von Patienten mit Lebererkrankungen innerhalb der weiten Grenzen von 70,8% bis 98% schwankt, die AP in diesen Seren also im Durchschnitt eine höhere Hitzetoleranz aufweist. Auf Grund dieser starken Streuung des Aktivitätsverlustes durch Hitzeinaktivierung lassen sich auch keine festen Grenzen angeben, innerhalb derer sich der Aktivitätsverlust von Seren mit erhöhtem Leberphosphatasen-Anteil bewegt. Dies bringen die Ergebnisse in Tabelle A zum Ausdruck. Somit läßt sich auch keine sichere Aussage über den Ursprungsort der vermehrten AP-Bildung bei einer Erhöhung der AP im Serum machen, wie es durch den Q-Wert geschehen soll.

Dies wird durch die Untersuchungen von Whitby und Moss (85) unterstützt. Nach ihren Angaben kann die Abnahme der AP-Aktivität in Serumproben während einer Temperaturexposition von 56°C in zwei Phasen eingeteilt werden. Die AP aus Knochen hat eine durchschnittliche "half-inactivation time" von 112 sec, die aus Lebergewebe von 456 sec. Die "half-inactivation time" variiert jedoch beträchtlich von Serum zu Serum, d.h. die Hitzestabilität des AP-Isoenzyms aus Leber bzw. Knochen ist in verschiedenen Seren verschieden. Einen variierenden Einfluß auf die Hitzestabilität haben pH, Proteingehalt und Harnstoff im Serum. Es können daher, bei konstanter Inkubationszeit, keine für alle Seren gültigen Grenzen angegeben werden, was den Aktivitätsverlust der einzelnen Enzymkomponenten betrifft und damit auch keine Aussagen über die Erhöhung eines der beiden Isoenzyme.

Diese Verhältnisse zeigen sich auch bei Betrachtung unserer Fälle. Nach der 15-minütigen Inkubation ist die Knochenphosphatase mit ihrer kurzen "half-inactivation time" bis auf einen geringen Prozentsatz inaktiviert. Schwankungen

dieser Zeit fallen durch die im Vergleich dazu lange Inkubationszeit nicht mehr ins Gewicht, die Q-Wert Grenzwerte werden eingehalten, ja sogar unterschritten. Anders liegen die Verhältnisse bei der längeren Inaktivierungszeit des Leberisoenzyms. Hier können sich Schwankungen ihrer Dauer stärker bemerkbar machen, was sich in der grossen Streubreite der Q-Werte zeigt. In den Fällen von Lebererkrankungen, in denen der Q-Wert für einen Anstieg der Knochenphosphatase spricht, scheint es sich um Seren mit einer hohen "half-inactivation time" der AP-Komponente aus der Leber zu handeln, die nach 15 min fast vollständig inaktiviert ist.

Die Bereiche der Q-Werte und ihre Interpretation bieten somit auf Grund der grossen Unterschiedlichkeit der "half-inactivation time" beider Isoenzyme bei verschiedenen Seren keine verlässliche Methode zur Differenzierung der AP-Isoenzyme aus Leber und Knochen.

Deshalb wurde die im nächsten Abschnitt beschriebene Methode der elektrophoretischen Auftrennung untersucht.

Versuch der A P - I S O E N Z Y M - Bestimmung aus menschlichem Serum und Gewebe durch E L E K T R O P H O - R E T I S C H E Auftrennung auf Zellulose-Acetat-Träger nach Fritsche (28) und Rhone (64-66)

Material und Methoden

Zur Bestimmung der AP-Isoenzyme wurde menschliches Serum und Leber- bzw. Knochengewebe verwendet. Die Seren wurden vier bis acht Stunden nach Entnahme durch Punktion einer Armvene zur Bestimmung verwendet. Jeweils ca 150 g Leber- und Knochengewebe wurde ca 24 h postmortal mit Unterstützung des Pathologischen Instituts der Klinik entnommen, wobei darauf geachtet wurde, daß es keine pathologischen Veränderungen aufwies. Die sofort anschließende Extraktion der AP erfolgte nach der Anleitung von Morton (49) mit n-Butanol (Merck) und Veronalpuffer pH 8,6 .

Durchführung der Elektrophorese:

Die Elektrophoresekammer (Bio-Rad-Laboratories) wird mit Tris-sodium-barbital Puffer pH 8,8 , I = 0,025 "Electra HR" (Helena Lab.) gefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung wird auf Titan III XW-Zellulose-Acetat-Platten (Helena Lab.) durchgeführt. Diese Platten werden 20 min in "Electra HR" Puffer vorgeweicht. Der Probenauftrag (Serum bzw. AP-Gewebsextrakt) erfolgt in der Mitte der Platten mit einem Applikator (Stempel), wie er für Serum-elektrophoresen verwendet wird. Jede Probe wird doppelt appliziert. Die Auftrennung erfolgt 20 min lang bei konstanter Spannung von 160 V. In dieser Zeit wird die Farbentwickler-Substratmischung hergestellt.

Die Trockensubstanz α -naphtol ASMX phosphoric acid "Alkaline Phosphatase ASMX Reagent" (Helena Lab.) wird mit 5 ml "Electra HR" Puffer aufgelöst. 2 ml dieser Lösung werden zur Auflösung des "Fast Blue RR Salt" (Helena Lab.) ver-

wendet. Ca ein ml dieser Farbentwickler-Substratmischung werden auf einer Glasplatte (7cm x 10cm) verteilt, die Titan III XW-Platten mit der Zellulose-Acetat Schicht blasenfrei darauf gelegt, rundum mit Tesafilm fixiert und 10 min bei 45°C im Trockenschrank getrocknet. Zur Auswertung werden die Platten über einem Lichtkasten betrachtet.

2.2. Ergebnisse

Bei Seren mit einer AP-Aktivität im Normalbereich ergaben sich - nach elektrophoretischer Auftrennung - bei der Anfärbung keine erkennbaren Banden. Seren mit deutlich erhöhter AP-Aktivität lieferten Bilder, wie sie in Abbildung 1 bis 7 zu sehen sind.

Serum 1 bis 3 und 5 bis 7 (Abb. 1 bis 3 und 5 bis 7) stammt von Patienten mit Hepatitis, Serum 4 (Abb. 4) von einem Patienten mit Knochenmetastasen. Die Zahl der Banden schwankt von einer bis vier, jedes Serum zeigt eine andere Bandenkonstellation. Um die Banden identifizieren zu können (Leber-AP bzw. Knochen-AP), wurden Elektrophoresen mit folgenden Extrakten durchgeführt:

Butanol-Extrakt aus Leber, pH mit 0,1 N Natronlauge auf 7,4 eingestellt (Abb.8)

Butanol-Extrakt aus Knochen, pH auf 7,4 eingestellt (Abb.9)

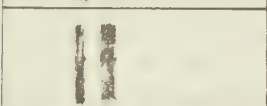
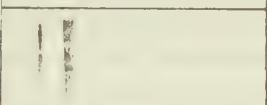
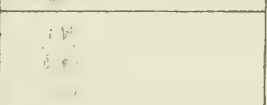
Gemisch aus Serum und Leber-Butanol-Extrakt im Verhältnis 9 : 1, wobei die AP-Aktivität des Serums im unteren Normbereich lag (Abb.10)

Gemisch aus Serum (AP im unteren Normbereich) und Knochen-Butanol-Extrakt im Verhältnis 9 : 1

Gemisch aus Leber-Butanol-Extrakt und Knochen-Butanol-Extrakt im Verhältnis 1 : 1.

Die AP-Extrakte aus Leber und Knochen wie auch die Gemische ergaben jeweils zwei Banden, wobei die Banden der Gemischproben langsamer wanderten. Während bei Auftrag des reinen Extraktes die Banden des Butanol-Extraktes aus Leber (Abb.8)

Abb. 1 bis 12: Elektrophoretische AP-Isoenzymauftrennung
auf Zellulose-Acetat-Träger

Kathode (—)	↓ Auftragsstelle	Anode (+)
Abb. 1		Serum, Hepatitis
2		Serum, Hepatitis
3		Serum, Hepatitis
4		Serum, Knochenmetastasen
5		Serum, Hepatitis
6		Serum, Hepatitis
7		Serum, Hepatitis
8		Butanol-Extrakt aus Leber
9		Butanol-Extrakt aus Knochen
10		Gemisch: Serum und Leberextrakt 9:1
11		Gemisch: Serum und Knochenextrakt 9:1
12		Gemisch: Leberextrakt und Knochenextrakt 1:1

schneller wanderten als die des Knochens (Abb.9), zeigte sich bei Auftrag der Gemische Serum und Knochen-Extrakt aus Leber bzw. Knochen kein Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit. Eine eindeutige Identifikation der Banden der Serumproben durch Vergleich mit den Banden der Extrakte bzw. Gemische ist offensichtlich nicht möglich.

3.3. Diskussion

Fritsche (28), Keiding (42) und Rhone (64-66) beschreiben in ihren Arbeiten über die AP-Isoenzymauftrennung auf Cellulose-Acetat übereinstimmend, daß sowohl bei Serum, als auch bei Gewebeproben, der AP aus der Leber eine konstante Bande in der α_2 -Region (bezogen auf ein normales Serumelektropherogramm) zuzuordnen ist und manchmal zusätzlich bei Lebererkrankungen eine inkonstante dünnere Bande in der α_1 -Region auftaucht. Dem Knochen ist eine breite konstante Bande in der prä- β -Region (als β_1 -Region bezeichnet) zuzuordnen (41,64). Diese sog. β_1 und α_2 Isoenzymen sind normalerweise im menschlichen Serum anwesend, jedoch nur teilweise durch elektrophoretische Technik trennbar (41). Nach Rhone (66) können bei Serumproben zusätzliche, in der α_1 und α_2 -Region gelegene Banden dem Duodenum oder der Gallenblase entstammen.

Bei Elektrophoresen mit AP-Extrakten aus Gewebeproben finden wir nicht nur bei der Leber, sondern auch beim Knochen zwei Banden, wobei sich für die Wanderungsgeschwindigkeit folgende Reihenfolge aufstellen läßt: am weitesten von der Auftragsstelle anodenwärts liegen eine Bande der Leberphosphatase, es folgen erste Bande der Knochenphosphatase und sofort daran angrenzend zweite Bande der Leber- und dann zweite Bande der Knochenphosphatase. Die richtige Lage der langsam wandernden Bande der Leber und der schnell wandernden Bande des Knochens kann im Serum zu einer Ver-

breiterung der dem Leberisoenzym zugeordneten Bande und damit zu einer falschen Interpretation führen.

Die langsamere Wanderungsgeschwindigkeit der AP-Banden in den Gemischen könnte auf das veränderte Milieu (zusätzliche Serumproteine, Elektrolyte) im Gegensatz zum reinen Extrakt zurückzuführen sein.

Da die Banden der reinen Extrakte eine andere Lage aufweisen als im Gemisch aus Serum und Extrakt, sich im Gemisch aus AP-Extrakt Leber und AP-Extrakt Knochen die Banden überlagern und die Wanderungsgeschwindigkeit der Banden der Gemische aus Serum und AP-Extrakt Leber und aus Serum und AP-Extrakt Knochen nicht unterscheiden, sind keine eindeutigen Zuordnungen der Serumbanden möglich.

Betrachtet man nun die Aussagefähigkeit der elektrophoretischen Auftrennung der AP-Isoenzyme im Hinblick auf das Interesse der Klinik, welches Enzym erhöht ist, so ist diese stark eingeschränkt durch die gefundenen Tatsachen, daß:

a) bei manchen Patientenserum inkonstant auftretende Banden gefunden wurden (42,66), die der Gallenblase, dem Duodenum, der Plazenta und Karzinomen (Regan Isoenzym) entstammen und zu einer Veränderung der Leber- und Knochenbanden führen können.

b) durch die Überlagerung der schnell wandernden Bande des Knochens mit der langsam wandernden Bande der Leber eine Erhöhung des Leberisoenzyms vorgetäuscht werden kann. Die Auftrennung der AP-Isoenzyme auf Zellulose-Acetat-Träger stellt daher keine Methode zur zuverlässigen, routinemäßigen Auftrennung dar.

Dies war der Grund dafür, daß wir im folgenden den Versuch unternahmen, die AP aus Leber zu reinigen, um die Möglichkeit einer immunologischen Differenzierung zu prüfen.

4. PRÄPARATION der ALKALISCHEN PHOSPHATASE aus MENSCHENLEBER

4.1. Material und Methoden

Ausgangsmaterial: Von sehr Leichen, die im Pathologischen Institut der Klinik zur Sektion gelangten, wurden ca 400 g schwere Leberstücke entnommen, in 10 mM Trisnuffer pH=8,4 blutfrei gewaschen und bei -60°C gelagert. Es wurde darauf geachtet, daß der Todeszeitpunkt nicht länger als 4 h zurücklag und die Leber keine pathologischen Befunde (z.B. Tumormetastasen, starke Verfettung) aufwies. Insgesamt wurden 3500 g Leber zur Enzympräparation verwendet.

Tests, die während der Enzymanreicherung benutzt wurden:
Die Bestimmung der AP-AKTIVITÄT erfolgte als optimierter kinetischer Test nach dem Reaktionsschema



Der Start der Reaktion wird durch Zugabe des Substrats 4-Nitrophenylphosphat ausgelöst. Durch die in der Probe enthaltene AP wird 4-Nitrophenol freigesetzt, dessen Konzentrationszunahme kontinuierlich photometrisch bei 405 nm wellenlänge bestimmt und mittels eines dem Photometer angeschlossenen Schreibers aufgezeichnet wird. Aus der Extinktionszunahme pro Zeiteinheit $\Delta E / \Delta t$ wird die phosphataseaktivität errechnet.

58,8 g Diäthanolamin (Merck), durch leichtes Erwärmen verflüssigt, und 57,5 mg Magnesiumchlorid (Merck) werden eingewogen und mit destilliertem Wasser auf 400 ml aufgefüllt. Mit 1 N HCl wird der pH der Lösung auf 9,8 eingestellt und die Lösung mit dest. Wasser auf 500 ml aufgefüllt: Pufferlösung.

2,13 g 4-Nitrophenylphosphat werden in 50 ml aqua dest. gelöst: Substrat.

0,01 ml der Probe (Leberextrakt) werde zusammen mit 0,5 ml

Pufferlösung in der Photometerküvette (Schichtdicke 1 cm) ca 5 min bei 25°C vorinkubiert, dann wird die Reaktion durch Zugabe von 0,05 ml Substratlösung gestartet und die Reaktion kontinuierlich am Schreiber bei einem Papiervorschub von 1 cm/min verfolgt (Eppendorf-Photometer).

Die Berechnung der Volumenaktivität erfolgt nach der Formel: $\frac{V \cdot 1000}{\xi \cdot d \cdot v} \cdot \Delta E / \Delta t = 3027 \cdot \Delta E / \Delta t$ (mU/ml), wobei V Gesamtvolumen, v Probevolumen, d Schichtdicke der Küvette, ξ Extinktionskoeffizient von 4-Nitrophenol = 18,5 cm²/uMol, $\Delta E / \Delta t$ Extinktionszunahme pro Zeiteinheit bedeutet. Beim Erwachsenen umfaßt der Normalbereich Werte bis 190 mU/ml.

Die Bestimmung der PROTEINKONZENTRATION erfolgte durch Eiweißfällung mit Dioxan und Trichloressigsäure und colorimetrischer Bestimmung nach Zusatz von Biuretlösung.

Als Standard wird Labtrol^R (Dade) verwendet und 1:6 verdünnt, was eine Proteinkonzentration von 11,5 mg/ml ergibt. Zu 0,5 ml Standard und 0,02 ml Probelösung wird je 1 ml Dioxan (Merck) zugefügt, 5 min gerüttelt, 2 min zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge) und der Überstand abgesaugt. Auf das Sediment von Standard und Probe wird je 1 ml 0,3 M Trichloressigsäure geschüttet, 5 min gerüttelt, 2 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nach Zusatz von je 1 ml Biuretreagenz auf die Sedimente wird 15 min gerüttelt und anschließend die Extinktion bei 546 nm Wellenlänge im Eppendorf-Photometer gemessen, Nullpunkt-einstellung mit Biuretreagenz. Die Proteinkonzentration errechnet sich als: $\frac{11,5 \cdot \text{Extinkt. d. Probe} \cdot 5}{\text{Extinkt. d. Standard}}$.

Zur orientierenden Proteinbestimmung wurde die Absorption der Proben bei 280 nm im Beckman DB-G grating spectrophotometer gemessen.

Zur Prüfung der Ergebnisse der Präparationsschritte wurden POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESEN durchgeführt:

Mit 50 mM Trispuffer pH 8,5 als Lösungsmittel werden folgende Lösungen zur Gelherstellung vorbereitet:

Lösung 1: 15 g Acrylamid (Fluka) und 0,4 g Bis-Acrylamid (Fluka) werden mit Puffer auf 50 ml aufgefüllt.

Lösung 2: 0,07 g Ammoniumperoxydisulfat (Fluka) wird mit Puffer auf 50 ml aufgefüllt.

Lösung 3: 24 ml 1 N HCl, 3,42 g Tris und 0,23 ml N,N,N',N'-Tetramethyl-äthylenediamin (Fluka) werden mit Puffer auf 50 ml aufgefüllt.

Diese Lösungen werden im Verhältnis 1 Teil dest. Wasser plus 2 Teile Lösung 1 plus 4 Teile Lösung 2 plus 1 Teil Lösung 3 vermischt und zur Gärung in den Gelzustand kochenfrei in Glassäulen (Durchmesser 0,5 cm, Höhe 6 cm) gefüllt. Die Proben werden mit Eppendorf-Pipetten der Größe 0,05 ml aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt bei einer Ausgangsspannung von 100 V und einer Ausgangsstromstärke von 1,5 mA pro Gel und einer Laufzeit von 8 bis 16 h. Die Anfärbung der Banden wurde entweder als Eiweißfärbung mit Amidoschwarz oder als spezifische AP-Färbung durchgeführt:

Bei der Amidoschwarz-Färbung wird das Gel ca 20 min in eine Farblösung aus 1 g Amidoschwarz 10 B (Fluka) in 100-iger Essigsäure gelegt und ca 20 h in 10%-iger Essigsäure entfärbt.

Für die spezifische AP-Färbung wird eine Farblösung aus 5 mM Na- β -Naphthyl-Asid-Phosphat und 1 mg/ml Fast Violet B (Helena Lab.) in 33 mM Trispuffer pH 9,5 hergestellt, das Gel 20 min darin gefärbt und anschließend ca 10 h in dest. Wasser entfärbt.

4.2. Reinigungsgang und Ergebnisse

4.2.1. 1. Schritt: Extraktion der AP mit n-Butanol

Die Leberstücke wurden bei Zimmertemperatur in jeweils ca 1 l 10 mM Trispuffer pH 8,5 aufgetaut. Sofort anschließend wurden 1 Gewichtsteil Leber und 10 Gewichtsteile n-Butanol (Merck) - Aqua dest. (v/v 1:1) in einem Mixer (Braun Star-mix) 15 min homogenisiert - wobei darauf geachtet wurde, daß die Temperatur im Homogenat 37°C nicht überstieg - , bei Zimmertemperatur 1 h lang gerührt und anschließend 40 min bei 13200 x g und 4°C zentrifugiert (Sorvall Super-speed RC 2-B Zentrifuge). Wir benutzten eine Mischung von Butanol und Wasser (statt Puffer), weil dadurch eine höhere Aktivitätsausbeute der AP erzielt werden konnte. AP-Aktivität fanden wir nur in der wässrigen Phase.

Ausgehend von 3500 g Leber betrug das Extraktionsvolumen 12,75 l mit einer AP-Gesamtaktivität von 8925 U. Nach Konzentration mit Diaflo Membranen UM 10 (Amicon) auf die Hälfte des Ausgangsvolumens und anschließender Dialyse gegen 10 mM Trispuffer pH 8,5 lag ein Gesamtvolumen von 6,55 l vor mit einer AP-Gesamtaktivität von 29732 U, einem Gesamtproteingehalt von 23,403 g und einer spezifischen Aktivität von 1271 mU/mg Protein. Es ergab sich also am Ende der ca fünftägigen Prozedur des Einengens und Dialysierens eine 3-fach höhere Gesamtaktivität als nach Abschluß der Butanol-Extraktion.

4.2.2. 2.Schritt: Fällung mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung pH 8,6

Eine mit Ammoniumsulfat gesättigte Lösung wurde mit 0,1 N Natriumazid auf pH 8,6 eingestellt. Anhand der Formel $V \cdot s_1 + x \cdot 100 = (V + x) \cdot s_2$, wobei V Volumen der Lösung, mit der die Fällung durchgeführt werden soll, s_1 Sättigung der Lösung mit Ammoniumsulfat, s_2 beschriebene Sättigung der Lösung mit Ammoniumsulfat und x zur Sättigung benötigtes Volumen Ammoniumsulfatlösung bedeutet, wurde das benötigte Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung berechnet, um eine 100%ige Sättigung unseres Extraktes zu erreichen. Bei 4°C wurde dem Extrakt tropfenweise unter stetigem Röhren die benötigte Menge zugeführt, anschließend bei 13200 x g und 4°C 20 min zentrifugiert (Sorvall Superspeed RC-2B). Das erhaltene Pellet wurde in 210 ml 5 mM Trispuffer pH 7,5 gelöst, der Überstand zur weiteren Sättigung mit Ammoniumsulfat verwendet. Mit dem Ziel einer fraktionierten Proteinfällung wurde auf diese Weise eine 40%- , 50%- , 60%- , 70%- und 80%-ige Sättigung mit Ammoniumsulfat des Extraktes hergestellt und die zugehörigen Pellets (P_1 bis P_5) einzeln gesammelt.

In Abb. 13 ist die spezifische AP-Aktivität der gelösten Pellets der einzelnen Sättigungsgrade graphisch dargestellt. Daraus ist ersichtlich, daß das Pellet bei 70% Sättigung deutlich die höchste spezifische Aktivität aufweist. Es ist durch die folgenden Werte charakterisiert: Volumen 210 ml, AP-Gesamtaktivität 2111 U, Gesamtprotein 5918 mg und spezifische Aktivität 3698 mU/mg Protein.

Diese Lösung wurde gegen 5 mM Trispuffer pH 7,5 dialysiert und mit Diaflo Membranen UM 10 (Amicon) auf 110 ml eingekonzentriert und für den nächsten Präparationsschritt verwendet.

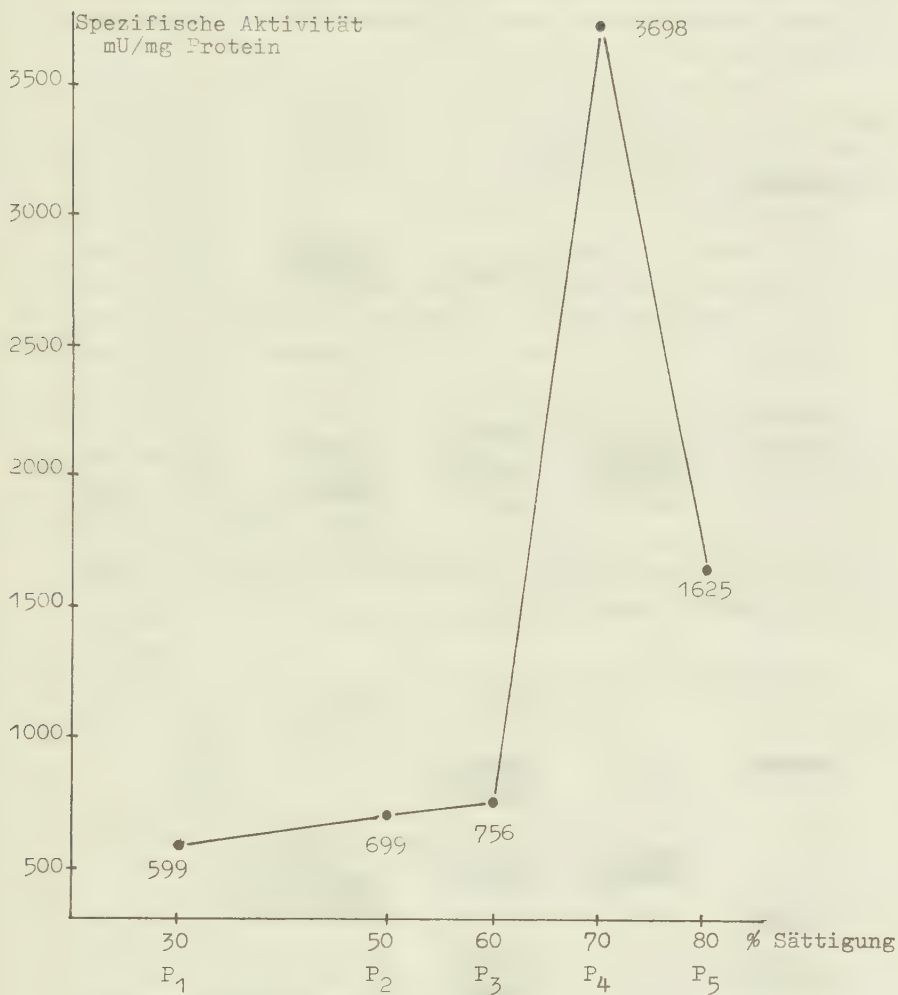


Abb. 13: Ammoniumsulfatfällung der alkalischen Phosphatase
aus Leber

Mit dem Butanol-Extrakt und den Pellets 3 bis 5 wurden Polyacrylamidgel-Elektrophoresen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen Abb. 14 und 15.

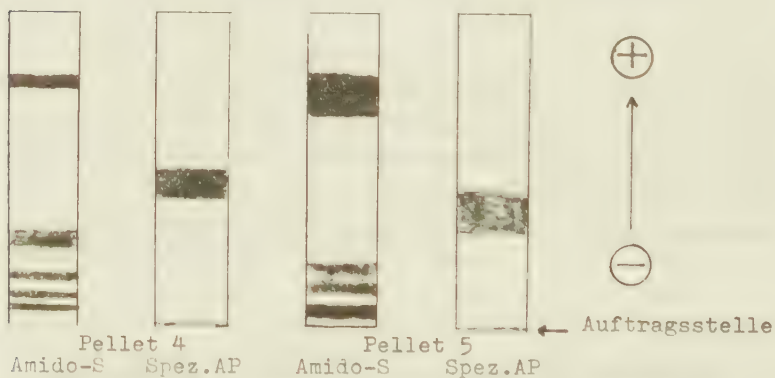


Abb. 15: Amidoschwarz-Färbung und spezifische AP-Färbung der Pellet 4 (70% Sättigung) und 5 (80% Sättigung) der Ammoniumsulfatfällung

4.2.3. 3.Schritt: Säulenchromatographie an Diäthylaminoäthyl-Zellulose

Eine Säule (Durchmesser: 2 cm, Höhe: 50 cm) wurde mit Diäthylaminoäthyl-Zellulose DE-52 (Whatman) gefüllt und mit 5 mM Trispuffer pH 7,5 äquilibriert. Nach Auftrag des Pellet 4 aus Schritt 2 wurde zur Eluierung eine NaCl-Lösung mit einem linearen Gradienten von 0 bis 200 mM und einem Gesamtvolumen von 900 ml angelegt. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 6 ml gesammelt, die Proteinkonzentration durch Absorption bei 280 nm Wellenlänge bestimmt. Das Elutionsdiagramm zeigt Abb. 16.

Die Fraktionen von 516 ml bis 618 ml wurden gepoolt. Sie ergaben eine AP-Gesamtaktivität von 7744 mU/ml, einen Gesamtproteingehalt von 440 mg und eine spezifische Aktivität von 17601 mU/mg Protein.

Das Ergebnis einer Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit diesem Eluat zeigt Abb. 17. Zum Vergleich erfolgte die Färbung einmal mit Amidoschwarz und einmal als spezifische AP-Färbung.

Zur Weiterverarbeitung erfolgte Dialyse und Konzentration über Diaflo Membranen UM 10 auf 30 ml.

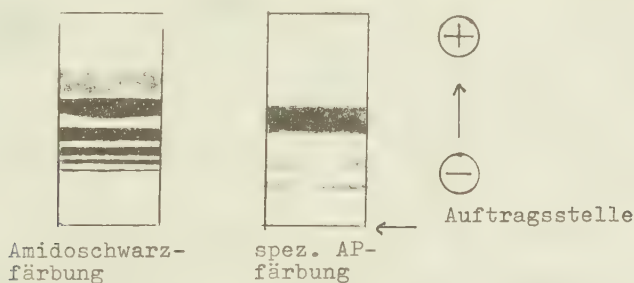


Abb. 17: Polyacrylamidgel-Elektrophorese des Eluats 516 ml bis 618 ml der Säulenchromatographie

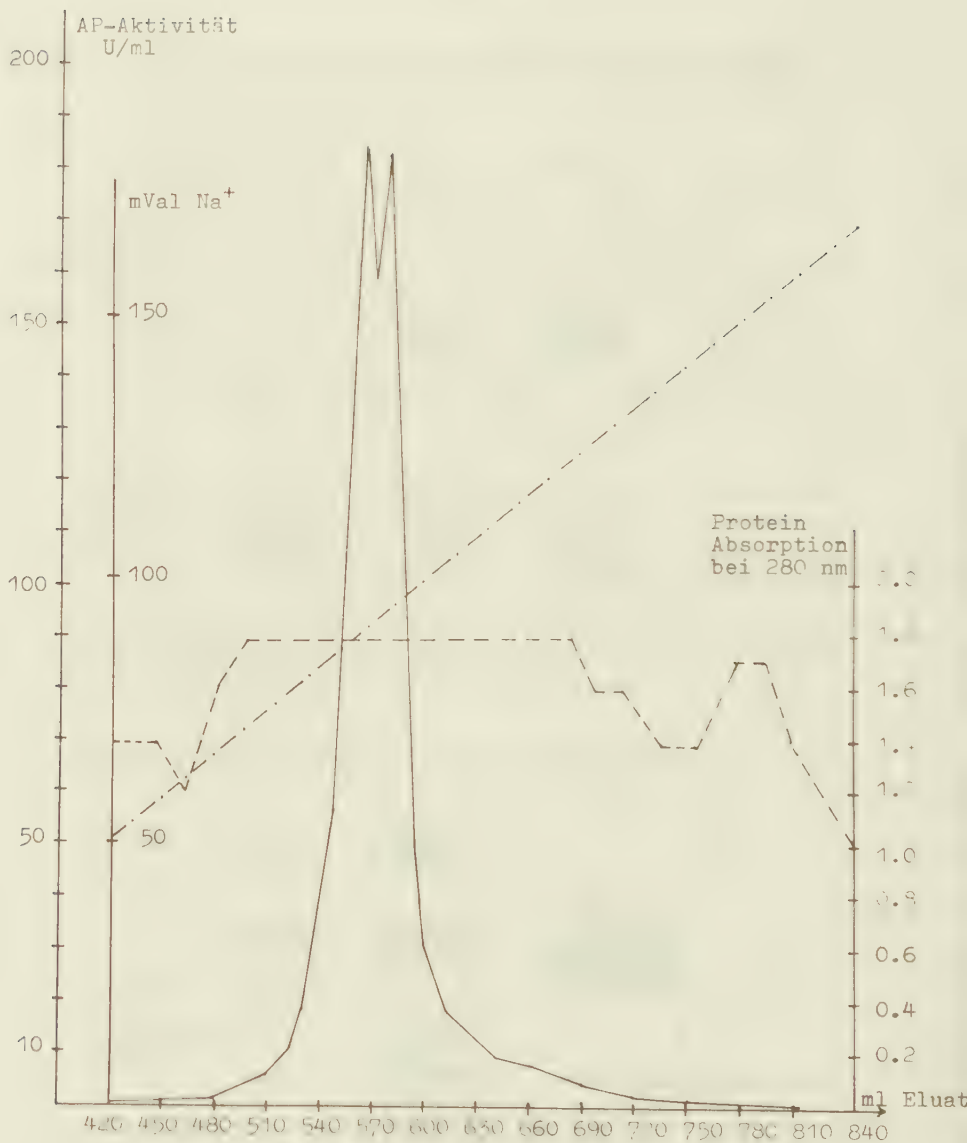


Abb. 16: Säulenchromatographie an Diäthylaminoäthyl-Cellulose (DE-52)

— AP-Aktivität, ---- Proteinkonzentration,
 - - - - - NaCl-Gradient

4.4.4. 4. Schritt: Gelfiltration

Eine Säule (Durchmesser: 2 cm, Höhe: 150 cm) wurde mit Sephadex G-200 Normal (Pharmacia) refüllt und mit 10 mM Trispuffer pH 8,5 äquilibriert. Nach Auftrag der AP-Lösung aus Präparationsschritt 3 wurde zur Elution 10 mM Trispuffer pH 8,5 mit 0,1 M NaCl verwendet und Fraktionen von je 5 ml gesammelt.

Das Ergebnis der Elution zeigt Abb. 18.

Die höchste AP-Aktivität wurde im Eluat 205 ml bis 240 ml gefunden, das einen rötlich braunen Farbton aufwies. Der Inhalt der betreffenden Röhrchen wurde gepoolt und für die folgenden Untersuchungen verwendet. Es wurde eine AP-Gesamtaktivität von 3994 U, ein Gesamtproteingehalt von 93,8 mg und eine spezifische Aktivität von 42585 mU/mg Protein bestimmt.

Abb. 19 zeigt eine Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit diesem Eluat in Amidoschwarz- und spezifischer AP-Färbung.

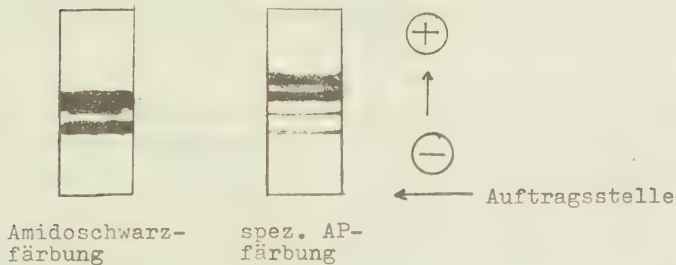


Abb. 19: Polyacrylamidgel-Elektrophorese des Eluats 205 ml bis 240 ml nach Gelfiltration

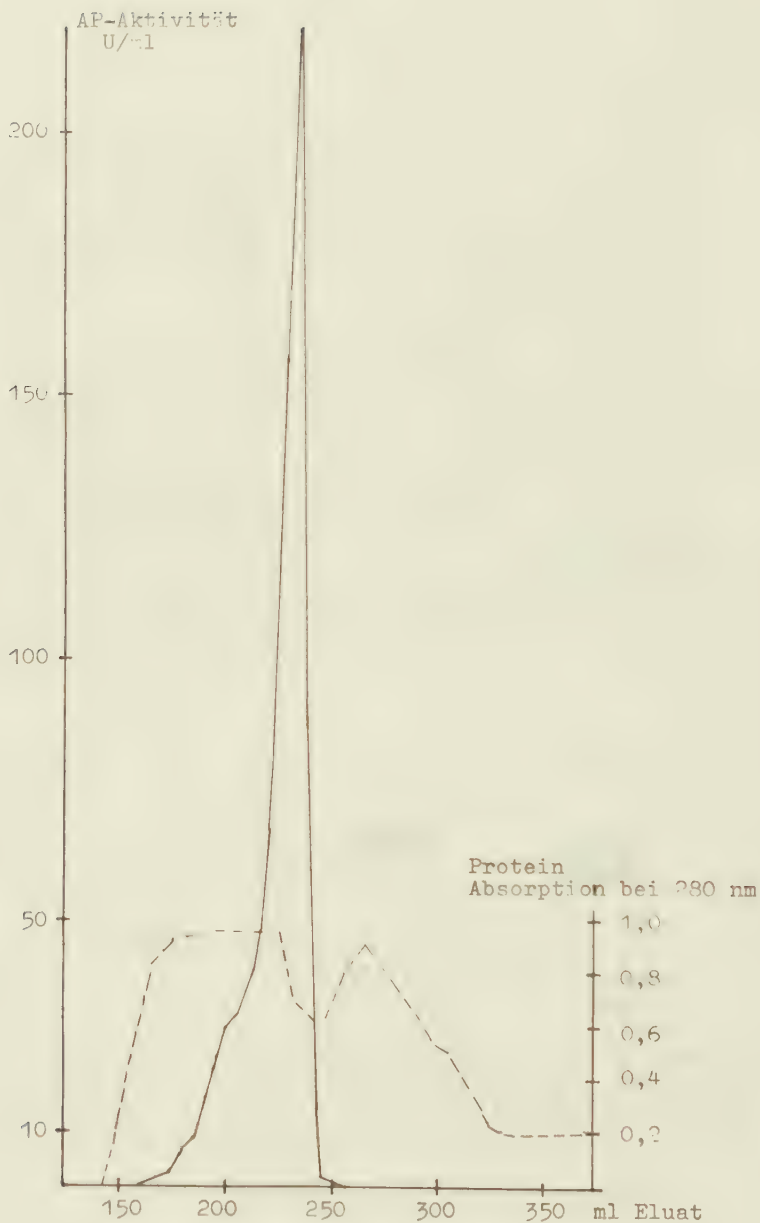


Abb. 18: Gelfiltration mit Sephadex G-200

— AP-Aktivität, - - - Proteinkonzentration

5. Vergleich und Zusammenfassung der vier Präparationsschritte

An den Anfang der Betrachtung sei Tab. B gestellt, die einen Überblick über den Gesamtreinigungsgang gibt.

Tab. B: Übersicht der Gesamtreinigung der AP aus menschlicher Leber

Ausgangsmaterial: 3500 g Leber

Schritt 1: Extraktion mit n-Butanol

Schritt 2: Fällung mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung pH 8,6

Schritt 3: Säulenchromatographie an DEAE DE-52

Schritt 4: Gelfiltration mit Sephadex G-200

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Volumen (ml)	6550	110	100	35
AP-Gesamtaktivität (U)	29732	7131	7744	3994
Gesamtprotein (mg)	23403	1918	440	93,8
Spezifische Aktivität (mU/mg Protein)	1271	3698	17601	42585

Beim ersten Schritt, der Butanol-Extraktion, ist auffällig, daß bei einer anfänglichen Gesamtaktivität von 8925 U, die sofort nach der Zentrifugation bestimmt wurde, nach fünf Tagen eine 3,3-fach höhere Gesamtaktivität von 29732 U ermittelt wurde. Diese Aktivitätszunahme wurde mehrmals an Proben nachgewiesen. Jedesmal war die AP-Gesamtaktivität der Proben nach einigen Tagen höher, als sofort nach Abschluß der Präparation.

Dadurch, daß wir bei der Ammoniumsulfatfällung nur Pellet 4 sammelten, sank die Gesamtaktivität auf ein Viertel der des Butanol-Extraktes ab, Pellet 4 brachte jedoch den Vorteil einer im Vergleich zu den anderen Pellets hohen spezi-

fischen Aktivität und führte zu einer 3-fachen Erhöhung derselben gegenüber Schritt 1. Schritt 3 brachte keinen Verlust an Gesamtaktivität und einen Anstieg der spezifischen Aktivität auf das 24-fache. Schritt 4 führte zum Verlust der Hälfte der Gesamtaktivität aus Schritt 3, jedoch zu einer nochmaligen Zunahme der spezifischen Aktivität um das 2,5-fache, was eine 33-fach höhere spezifische Aktivität gegenüber dem Ausgangsmaterial ergibt (vgl. Tab. C). Nimmt man als Bezugswert eine AP-Extraktion aus Leber nur mit Wasser, was zu einer spezifischen Aktivität von 235 mU/mg Protein führt, so entspricht unser Ergebnis einer 181-fachen Zunahme.

Tab. C: Vergleich der Präparationsschritte

Präparationsschritt	Verlust an AP-Gesamtaktivität	-fache Erhöhung der spez. Aktivität
1	0	0
2	65	3
3	64	18,8
4	86,5	33,5

Abb. 21 zeigt einen Vergleich der polyacrylamidgel-Elektrophoresen der Schritte 3 und 4 bei spezifischer AP-Färbung. Anschaulich verdeutlicht wird der Reinigungsprozeß nochmals durch Abb. 22. Sie zeigt bei Amid-schwarz-Färbung einen Vergleich der Präparationsschritte 2, 3 und 4.

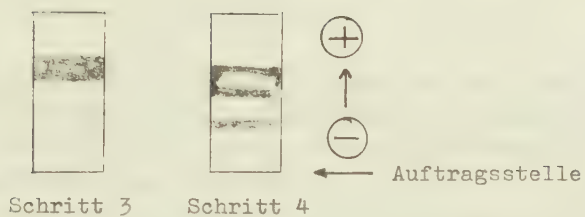


Abb. 21: Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit spezifischer AP-Färbung

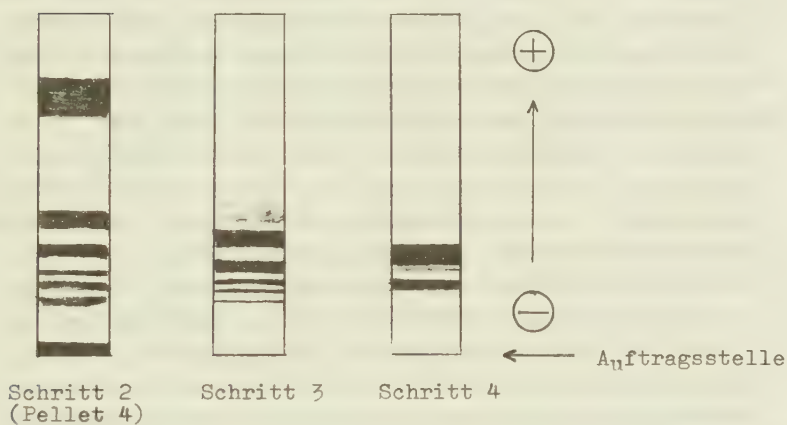


Abb. 22: Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit Amidoschwarz-Färbung

4.3. Diskussion

In der Literatur sind zahlreiche Versuche beschrieben, die AP aus Gewebeproben zu extrahieren und zu reinigen (2,3, 8,11,14,16,18,20,25,32,35,36,49,50,51,52,55,74,77,78,82), doch handelt es sich bei den meisten Arbeiten um AP-Extraktionen aus tierischem Gewebe oder aus menschlicher Plazenta. Angaben über eine Reinigung der AP aus Menschenleber, die über eine Butanol-Extraktion hinausgeht, sind selten (25, 52,77), Angaben über eine 100%-ige Reinigung und Isolierung der Leber-AP liegen nicht vor.

Nahezu alle Autoren, die über AP-Präparationen berichten, setzen die Behandlung der Gewebeproben mit n-Butanol an den Anfang. Die Extraktion mit Butanol ergibt in unserem Versuch eine ca 5-fach höhere spezifische Aktivität als nach reiner Pufferextraktion. Nach übereinstimmender Ansicht löst das Butanol die AP aus ihrer Bindung an die Zellmembran (22,82). Um eine größere Zerstörung der Zellmembranen zu bewirken, verwendeten wir dest. Wasser, schufen also ein für die Zellen hypotones Milieu.

Die Beobachtung, daß fünf Tage nach Abschluß der Butanol-Extraktion die Gesamtaktivität das dreifache der anfänglichen beträgt, scheint darauf zurückzuführen zu sein, daß sich in der wässrigen Phase trotz Zentrifugation noch Zellmembranbestandteile befinden und im Laufe der Zeit des Dialysierens, ev. unter Mitwirkung von noch vorhandenen Butanolresten, die AP aus der membrangebundenen Form gelöst wird. Andererseits kann eine Aufspaltung in aktive Untereinheiten oder Ausschaltung von Inhibitoren nicht ausgeschlossen werden.

Als zweiten Schritt führen manche Autoren (2,25,77) eine Eiweiß-Präzipitation mit Aceton durch, an Stelle oder vor der Ammoniumsulfatfällung. Wir führten letztere sofort als zweiten Schritt aus. Wie Abb. 13 deutlich zeigt, erbrachte

das Pellet bei 70% Sättigung mit Abstand die höchste spezifische Aktivität.

Schritt 3 und 4 unserer Präparation zeigen die gleichen Elutionskurven der AP wie in den Arbeiten von Sussman (77) und Fishman (75): ein einziger steiler AP-Aktivitätsgipfel.

Die Betrachtung der Abbildungen der Polyacrylamidgel-Elektrophoresen zeigt, daß ab Schritt 3 in der spezifischen Färbung drei Banden auftreten, während bei der Ammoniumsulfatfällung (Schritt 2) nur eine einzige breite zu sehen ist. Die am schnellsten wandernde Bande korrespondiert mit der Wandergeschwindigkeit der Bande des Pellet 4, dürfte also dasselbe Enzymmolekül darstellen, während die beiden langsam wandernden neu hinzukommen und ev. katalytisch aktive Teile des ursprünglichen Enzyms sind. Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, daß in diesem Schritt 3 eine geringe Zunahme der AP-Gesamtaktivität gefunden wird.

Die rötlich braune Farbe der Lösung des 4. Präparationsschrittes dürfte durch ein Hämoprotein verursacht sein und den höhermolekularen Anteil bei der Reinheitsprüfung in der analytischen Ultrazentrifuge darstellen.

Da das Ziel, die Herstellung eines hoch gereinigten Enzyms zur Immunisierung, erreicht war, wurde im Rahmen dieser Arbeit auf weitere enzym-chemische Analysen verzichtet und das Problem der immunologischen Differenzierung der AP aus Leber und Knochen in Angriff genommen.

5. Versuche zur IMMUNOLOGISCHEN DIFFERENZIERUNG der alkalischen Phosphatase des Menschen aus Leber und Knochen

5.1. Material und Methoden

Ziel dieser Versuche war es, einen Antikörper gegen AP aus Leber zu bekommen und dessen Reaktion mit AP-Extrakten aus Knochen zu prüfen.

Zu diesem Zweck wurden vier junge Kaninchen (Kaninchen 1 bis 4) mit unser hoch gereinigten AP aus Leber (Abschnitt AP-Präparation) immunisiert. Ein fünftes Kaninchen wurde als Negativkontrolle mit Trispuffer pH 7,5 immunisiert. Die Art der Antigenezufuhr wurde bei den einzelnen Kaninchen variiert. Die subcutane (s.c.) Applikation erfolgte in die Hautfalte über dem Genick, die intramuskuläre (i.m.) Injektion in die Oberschenkelmuskulatur und die intravenöse (i.v.) Applikation in die Ohrvenen. Zur Blutentnahme wurden die Kaninchenohren mit Xylol hyperemisiert und mit Kanülen Nr. 12 (Braun) punktiert.

Der Antigenlösung wurde teilweise die gleiche Volumenmenge an Freundschem Adjuvans komplett bzw. inkomplett (Behringwerke) zugefügt, um den Reiz zur Antikörperbildung zu verstärken.

Die Immunisierung wurde im einzelnen wie folgt durchgeführt: Den Kaninchen 1 bis 4 wurde subcutan 3 mg AP-Protein mit Zusatz von Freundschem Adjuvans komplett, dem Kaninchen 5 1 ml Trispuffer pH 7,5 mit Freundschem Adjuvans komplett subcutan zur Grundimmunisierung injiziert. Alle Kaninchen zeigten nach ein bis drei Wochen an der Einstichstelle knotige bis ulceröse Veränderungen.

Über die folgenden Antigen-Applikationen (Booster Impfungen) und die Blutentnahmen gibt Tabelle D Auskunft.

Tab. D: Booster Impfungen und Blutentnahmen

Kaninchen	Tag	Booster Impfung			Blutentnahmetag
		mg AP-Protein	F.Adjuvans	Applikation	
1	30.	1,0	--	i.v.	50.
	33.	1,5	--	i.v.	63.
2	30.	1,5	inkomplett	i.m.	50.
	37.	2,0	--	i.m.	63.
3	29.	1,0	--	i.m.	45.
	32.	1,0	--	i.m.	
4	29.	1,0	--	i.m.	45.
	32.	1,5	--	i.v.	58.
	58.	0,5	inkomplett	i.m.	72.
5		ml Trispuffer			
	29.	1,0	--	i.m.	45.
	32.	1,0	--	i.m.	
	37.	1,0	--	i.m.	

Die in den Kaninchenserum enthaltenen Antikörper wurden auf ihre Reaktion mit dem verwendeten Antigen, mit Butanol-Extrakten der AP aus Leber, Knochen und Dünndarm und mit Antikörpern getestet. Die Darstellung der Antikörper-Extrakte erfolgte wie im Abschnitt "AP-Präparation; Schritt 1" beschrieben. Als Prüfmethode wurden Agargel-Präzipitation nach Ouchterlony und Immuntitration verwendet.

Agargel-Präzipitation: Zur Zubereitung des Gels werden 1,5 g Difco-Bacto-Agar (Difco-Labor.) in 100 ml 5 mM Tris-puffer pH 7,5 durch Erwärmen gelöst. Zur Verhütung von Bakterienwachstum werden 10 mg Thiocid beigelegt. Diese Lösung wird vor Erkalten gleichmäßig in ca 2 mm Schichtdicke auf Dia-Positiv-Gläser aufgetragen. In die Gelschicht werden Löcher (Zahl vom Versuch abhängig) mit einem Durchmesser von 2 mm und einem gegenseitigen Abstand von ca 6 mm gestanzt. Diese Löcher werden mit Antigen- bzw Antikörperlösung gefüllt und die Glasplättchen ca 24 h in eine feuchte Kammer gelegt. Anschließend erfolgt Färbung mit Amidoschwarz oder spezifischer AP-Färbung wie im Abschnitt "AP-Präparation" bei der Polyacrylamidgel-Elektrophorese beschrieben.

Immuntitration: Die Bestimmung der AP-Aktivität erfolgt als optimierter kinetischer Test (siehe Abschnitt "AP-Präparation"). Mit den Seren der immunisierten Kaninchen (Antiseren) werden 10-fache Verdünnungen hergestellt. Diesen Serumverdünnungen wird die gleiche Menge Antigen beigegeben, gut gerührt, 40 h bei 4°C inkubiert, 30 min bei 10000 x g zentrifugiert und die AP-Aktivität im Überstand bestimmt. Zur Kontrolle dient das Serum von Kaninchen 5 (mit Tris-puffer immunisiert). Nachstehend ist das verwendete Titrationsschema wiedergegeben:

Kontrolle

	I	II	III
Röhrchen	1	2	3
Antiserum (ml)	0,3	0,3	0,3
NaCl 0,9 % (ml)		0,3	0,3
Antigen (ml)	0,3	0,3	0,3
Titer	1:2	1:4	1:8
Serum von Kaninchen 5			
48 h bei 4°C inkubieren, 30 min bei 10000xg zentrifugieren, AP-Aktivitätsbestimmung im Überstand			
AP-Aktivität (mU/ml)			

5.2. Ergebnisse

5.2.1. Agargel-Präzipitation nach Schickler nach der ersten Blutentnahme (45 bis 50 Tage)

Nach der ersten Blutentnahme wurde die Reaktion der gewonnenen Antiseren mit dem verwendeten Antigen (auch gereinigte AP aus Leber), Butanol-Extrakt der AP aus Leber und Knochen, dem Eluat der DE-52 Säule (3. Präparationsschritt) und Patientenserum mittels Agargel-Präzipitation geprüft.

Abb. 23 zeigt die Reaktion der Antiseren mit der zur Immunisierung verwendeten gereinigten AP aus Leber. Das Serum des mit Puffer immunisierten Kaninchens ergibt keine Präzipitationslinien, während die Seren der Kaninchen 1 mit 4 mit dem unverdünnten Antigen deutliche Präzipitationslinien liefern, bei Kaninchen 1 und 2 jeweils nur eine, bei Kaninchen 3 und 4 zwei, eine breite und eine scharfe dünne Linie. Das verdünnte Antigen ergibt nur bei Kaninchen 3 und 4 eine sichtbare Präzipitation.

Die Reaktion der Antiseren mit einem Butanol-Extrakt der AP aus Leber und aus Knochen zeigt Abb. 24. Durch Konzentration über Diaflo UM 10 Membranen (Amicon) wurde die AP-Aktivität der beiden Extrakte einander angeglichen. Die Seren der Kaninchen 1 mit 4 ergeben mit dem Butanol-Extrakt aus Leber deutliche Präzipitationslinien, die stärkste das Serum von Kaninchen 4. Das Serum von Kaninchen 5 zeigt keine Reaktion. Der Butanol-Extrakt aus Knochen ergibt mit keinem Serum eine Präzipitation.

Im nächsten Versuch wurde die Reaktion der Antiseren mit der gereinigten AP aus Leber (aus Präparationsschritt 4) und dem Eluat der DE-52 Säule des 3. Präparationsschrittes, also einer weniger reinen Form der AP, verglichen. Das

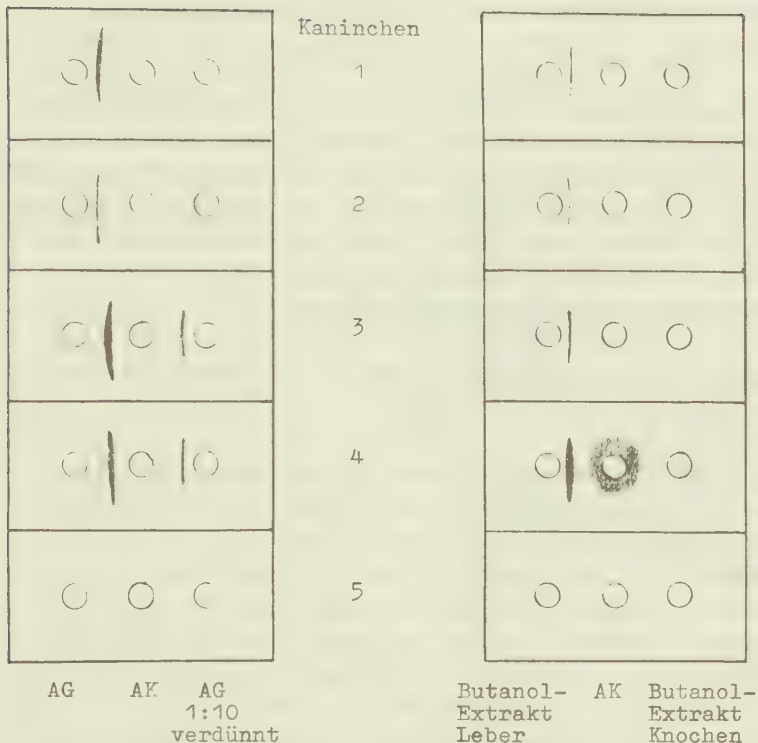


Abb. 23: Agargel-Präzipitation Kaninchen-Antiseren (AK) gegen zur Immunisierung verwendete AP aus Leber (AG)

Abb. 24: Agargel-Präzipitation Kaninchen-Antiseren (AK) gegen AP-Extraktion mit Butanol aus Leber bzw. Knochen

Ergebnis zeigt Abb. 25. Mit beiden Lösungen bilden die Seren der Kaninchen 1 mit 4 deutliche Präzipitationslinien.

Mit dem Serum des Kaninchen 4 wurde die Reaktion mit zwei Patientenserum geprüft. Abb. 26 zeigt das Ergebnis. Die Patientenserum erzeugen einen breiten und diffus konzentrierten Präzipitationsbande mit dem Kaninchen Serum. Die erhaltenen Banden sind jedoch 3 bis 5 mal so breit wie die Banden aus den vorhergehenden Versuche, obwohl die AP-Aktivität der Patientenserum geringer war.

5.1.1. Agar-Gel-Präzipitation nach Ouchterlony nach der zweiten Blutentnahme (58 bis 63 Tage)

Als Antiserum wurden die Seren der Kaninchen 1, 2 und 4 (das 3. Kaninchen war nach der 1. Blutentnahme verendet) verwendet, als Reaktionspartner diente die zur Immunisierung verwendete AP-Lösung. Abb. 27 zeigt den Versuch. Die spezifische AP-Färbung vor Auswaschen der Gele läßt erkennen, daß nur Kaninchen 4 einen hohen Antikörpertiter entwickelt hat, denn nur sein Serum führt zum Auslöschphänomen: ein hoher Antikörpertiter verhindert die Weiterdiffusion des Antigens. Die spezifische Färbung nach Auswaschen zeigt, daß der präzipitierte Antigen-Antikörperkomplex katalytisch aktiv bleibt.

Zusammenfassend läßt sich aus den Versuchen feststellen: Die Seren der mit AP aus Leber immunisierten Kaninchen enthalten Antikörper, der mit diesem Antigen, mit einem Butanol-Extrakt aus Leber, mit Patientenserum, jedoch nicht (zum Zeitpunkt der 1. Blutentnahme) mit einem Butanol-Extrakt aus Knochen reagiert. Die Antikörper führen zur Präzipitation mit dem Antigen, der AG-AK-Komplex behält seine Enzymaktivität bei.

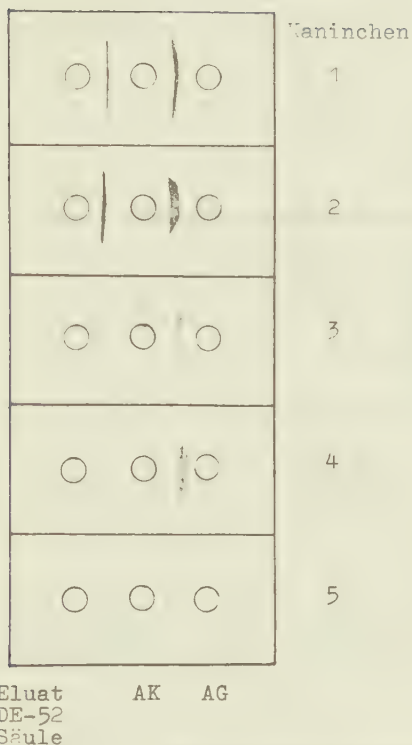


Abb. 25: Agargel-Präzipitation Kaninchen-Antiserum (AK) gegen Eluat der DE-52 Säule (3. Präparationsschritt) bzw. gegen zur Immunisierung verwendete AP aus Leber (AG)

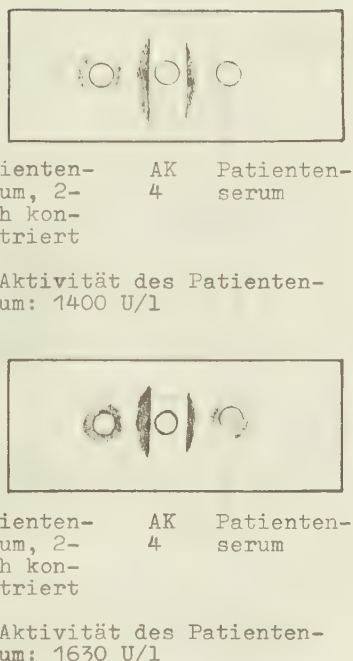
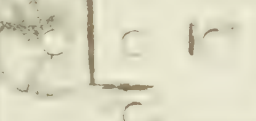


Abb. 26: Agargel-Präzipitation Antiserum von Kaninchen 4 (AK) gegen Patientenseren, normal und 2-fach konzentriert

Kaninchen 1 	1 	1 
Kaninchen 2 		
Kaninchen 4 AG AK AG 	4 	

Amidoschwarz-
färbung

Spezifische AP-Fär-
bung vor Auswaschen
des Gels

Spezifische AP-Fär-
bung nach Auswaschen
des Gels

Abb. 27: Agargel-Präparation: Kaninchen-Antisera (AK) nach der dritten Blutentnahme gegen zur Immunisierung verwendete AP aus Leber (AG) unverdünnt, 1:10 und 1:20 verdünnt

5.2.3. Immuntitrationsversuche mit dem Antiserum von Kaninchen 4 nach der zweiten (48. Tag) und dritten (72. Tag) Blutentnahme

Im Gegensatz zur Agargel-Präzipitation, bei der nur präzipitierte Proteinkomplexe, nämlich der Antigen-Antikörper-Komplex, nachgewiesen werden, jedoch keine Aussagen über den Grad der Hemmung der Enzymaktivität gemacht werden können, bietet gerade die Immuntitration diese Möglichkeit. Der Grad der Hemmung ist, neben der Spezifität des Antikörpers, abhängig vom Konzentrationsverhältnis Antigen zu Antikörper, das in den einzelnen Titerstufen variiert wird, indem das Antiserum mit den Antikörpern zunehmend verdünnt wird.

So läßt sich in unserem Versuch feststellen, in welchem Ausmaß der Antikörper unserer Kaninchenserum die AP aus Leber und Knochen bindet, ob sich hier ein Unterschied zwischen beiden Isoenzymen zeigt und damit eine immunologische Differenzierung möglich ist.

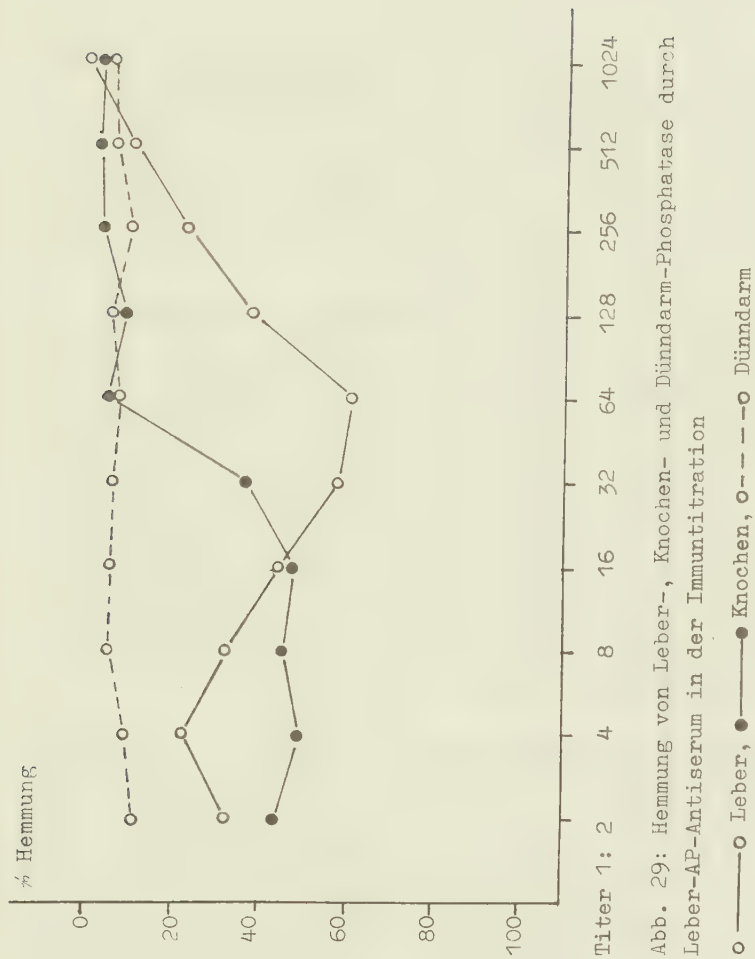
Im folgenden werden die Ergebnisse drei verschiedener Versuchsreihen beschrieben:

In der ersten Versuchsreihe wurde geprüft, wie stark unser gewonnener Antikörper die AP-Aktivität von Butanol-Extrakten aus Leber, Knochen und Dünndarm in der Immuntitration hemmt, indem er mit der AP Komplexe bildet, die durch Zentrifugation abgesondert werden, womit die AP-Aktivität im Überstand abnimmt. Abb. 28 zeigt den Vergleich zwischen Leber- und Knochen-AP, wobei als Antiserum das Serum von Kaninchen 4 nach der zweiten Blutentnahme fungierte. Es zeigt sich, daß bis zur Titerstufe 1:8 kein nennenswerter Unterschied des Hemmungsverhaltens besteht, jedoch bei einer Titerstufe von 1:64 selektiv die Leber-AP bis zu 90% gehemmt wird. Mit dem Antiserum der dritten Blutentnahme wurde ein weiterer Vergleich zwischen AP-Butanol-Extrakten aus Leber, Knochen und Dünndarm durch-



Abb. 28: Hemmung der AP-Aktivität durch Antiserum gegen menschliche Leber AP (Immunitation)

● —● Leber-Antigen - Antiserum
● - - - ● Leber-Antigen - Antiserum



geführt. Das Ergebnis zeigt Abb. 29. In den Titerstufen bis 1:8 wird sowohl Leber- wie Knochenphosphatase zu ca 50% gehemmt, in den Titerstufen 1:64 und 1:128 nimmt selektiv die Aktivität der Leberphosphatase ab, die Hemmung der Knochenphosphatase schwindet. Die Aktivität der Dünndarmphosphatase wird nicht beeinflusst.

In der zweiten Versuchsreihe wurde das Hemmungsverhalten von Leber- und Knochenphosphatase nach Absorption des Leberphosphatase-Antiserums an Butanol-Extrakt aus Knochen geprüft. Durch die Absorption des Leber-AP-Antiserums an einen Butanol-Extrakt aus Knochen sollen die mit Knochen-AP reagierenden Antikörper des Antiserums besetzt und damit ausgeschaltet werden, um ein nur mit Leber-AP reagierendes Antiserum zu erhalten.

Zu diesem Zweck wurde eine Immuntitration mit dem Antiserum nach der dritten Blutentnahme und einem Butanol-Extrakt aus Knochen durchgeführt und die Titerstufe mit der höchsten AP-Aktivitätshemmung bestimmt. Mit dem Überstand des betreffenden Röhrchens als "gereinigtes" Antiserum wurden weitere Immuntitrationsen mit Butanol-Extrakt aus Leber und Knochen durchgeführt. Das Ergebnis dieser Titrationsen im Vergleich zu Titrationsen ohne Absorption zeigt Abb. 30. Nach Immunabsorption des Antiserums an Butanol-Extrakt aus Knochen erhält man ein Antiserum, das mit Knochenphosphatase nicht mehr reagiert, dessen hemmender Effekt auf die Leberphosphatase jedoch voll erhalten bleibt.

Der Prüfung des Hemmungsverhaltens von Leber- und Knochenphosphatase durch Leber-AP-Antiserum nach Zugabe von Kaninchen-Anti-Gamma-Globulin diente die dritte Versuchsreihe. Da die Antikörper des Kaninchenserums zur Gruppe der Gamma-Globuline gehören, können sie durch Anti-Gamma-Globulin gebunden und durch Zentrifugation eliminiert werden. Dadurch besteht die Möglichkeit, Komplexe aus AP-Antikörper und Leber-AP an Anti-Gamma-Globulin zu binden und durch

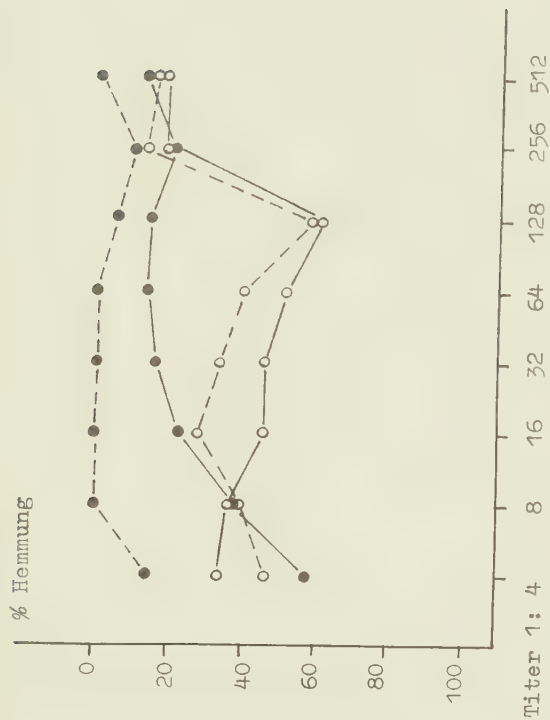
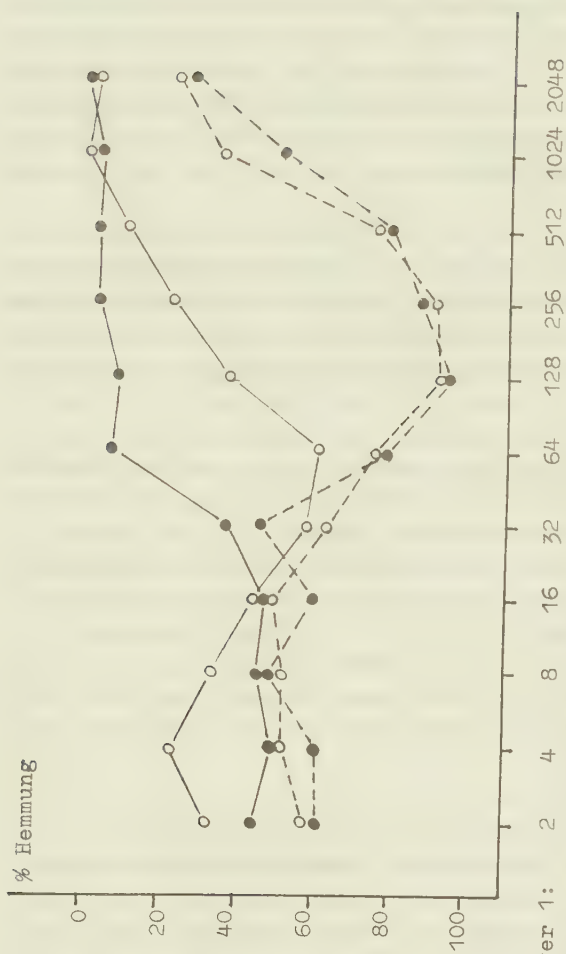


Abb. 30: Hemmungsverhalten vor und nach Absorption des Leber-AP-Antiserums an Knochen-Extrakt

- — Hemmung der Leber-AP vor Absorption
- - - - Hemmung der Leber-AP nach Absorption
- — Hemmung der Knochen-AP vor Absorption
- - - - Hemmung der Knochen-AP nach Absorption

Zentrifugation zu sedimentieren.

Es wurden Immunisationen mit Antiserum nach der dritten Blutentnahme und Butanol-Extrakten aus Leber und Knochen durchgeführt, wobei je Titerstufe der entsprechenden Antiserumschema jeder Titerstufe 0,1 ml Kaninchen-Anti-Gamma-Globulin (Behringwerke) 1:2 verdünnt zugesetzt wurde. Das Ergebnis zeigt Abb. 31. Die Zugabe von Kaninchen-Anti-Gamma-Globulin führt bei einer Titerstufe von 1:128 zu einer ca 90%-igen Hemmung sowohl der Leber- wie der Knochenphosphatase.



Titer 1: 2 4 8 16 32 64 128 256 512 1024 2048

Abb. 31: Hemmung von Leber- und Knochenphosphatase durch Leber-AP-Antiserum mit und ohne Zugabe von Kaninchen-Anti-Gamma-Globulin (KAGG)

○ — Leber ohne KAGG ● — Knochen ohne KAGG
 ○ - - - Leber mit KAGG ● - - - Knochen mit KAGG

5.3. Diskussion

Von allen vier verwendeten Kaninchen ergab das Serum des Kaninchen 4 den höchsten Antikörpertiter, wie die einzelnen Versuche zeigen. Der Grund dafür dürfte nicht die Antigenapplikationsart gewesen sein, denn auch Kaninchen 1 erhielt eine i.v. Injektion, sondern in individuell unterschiedlicher Ausbildung des Immunsystems der Kaninchen liegen. Die ulcerösen Veränderungen am Ort der ersten Antigenapplikation sind erfahrungsgemäß auf den Zusatz von Freund'schem Adjuvans zurückzuführen.

Sussman (77) verwendet als Antikörper-Produzenten Schafe. Nach seinen Angaben wird die AP durch die Antikörper nicht präzipitiert, unsere Agarose-Präzipitationsversuche zeigen jedoch deutliche Präzipitationsreaktionen. Das ist, wie auch in unseren Versuchen zeigt der Antikörper-Antigen-Komplex AP-Aktivität.

Unser Leberphosphatase-Antikörper reagiert im Agarose-Präzipitationsversuch mit dem Antigen, einem Butanol-Extrakt aus Leber, mit Patientenseren, jedoch nicht mit Butanol-Extrakt aus Knochen. Es entstammt der ersten Blutentnahme. Wie jedoch die Immuntitrationsversuche nach der dritten Blutentnahme zeigen, wird auch die Knochenphosphatase bei höherer Konzentration des Antikörpers in der ersten Titerstufe gehemmt, so daß die fehlende Reaktion nach der ersten Blutentnahme in einer zu geringen Antikörperkonzentration begründet sein mag.

Hinsichtlich der Enzymaktivität läßt sich mit dem Antiserum zwischen Leber-, Knochen- und Lungenphosphatase unterscheiden. In der Immuntitration beobachten wir bei Antikörpertitern um 1:64 und 1:128 eine selektive Hemmung der Leberphosphatase bis zu 100%, ohne messbare Hemmung der Knochenphosphatase. Bei niedrigen Titerstufen tritt aller-

dings auch eine Hemmung des Knochenenzym auf. Die Dünndarmphosphatase wird durch das Antiserum in ihrer Aktivität nicht beeinflusst.

Die Hemmung der Knochenphosphatase läßt sich durch Absorption des Antiserums mit Butanol-Extrakt aus Knochen beseitigen, ohne Beeinträchtigung der Hemmwirkung auf die Leberphosphatase.

Bei Verwendung von Kaninchen-Anti-Gammaglobulin wird bei einer Titerstufe von 1:128 eine ca 90 %-ige Aktivitäts-
hemmung von Leber- und Knochenphosphatase gefunden.

Die vorliegenden Versuchsergebnisse zeigen die grundsätzliche Möglichkeit, durch Immuntitration die Organzugehörigkeit der AP zu differenzieren. Für weitere Aussagen ist jedoch eine hochgradige Reinigung der AP aus Knochen notwendig, um auch gegen Knochenphosphatase Antikörper zu gewinnen und ihre Reaktionen mit Leberphosphatase testen zu können. Diese Versuche werden zeigen, wie weit Leber- und Knochenphosphatase immunologisch unterscheidbar sind.

Die von Ohlen (60) angegebene Methode der quantitativen Isoenzymbestimmung der AP aus Leber und Knochen durch Hitzeinaktivierung wird auf ihre Aussagekraft geprüft, indem die Ergebnisse mit dem klinischen Bild korreliert werden. Es zeigen sich in 68% der Fälle fehlende Übereinstimmung zwischen Q-Wert und Diagnose. Gründe für die fehlende Korrelation werden diskutiert.

Die Isoenzyme der AP aus Serum und Gewebeproben (Leber und Knochen) werden elektrophoretisch auf Zellulose-Acetat aufgetrennt. Die Schwierigkeit der Zuordnung der erhaltenen Banden zu den entsprechenden Isoenzymen und damit auch die eingeschränkte Verwendungsmöglichkeit für die Diagnostik wird aufgezeigt. Leber- und Knochenextrakt ergeben jeweils zwei Banden, wobei die "Leberbanden" eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit besitzen. Die Ergebnisse der Elektrophoresen werden mit den Angaben in der Literatur verglichen.

Mit dem Ziel der Herstellung eines reinen Antigens wird die AP aus menschlicher Leber in vier Präparationsschritten hoch gereinigt:

1. Schritt: Extraktion mit n-Butanol

2. Schritt: Filtrat mit 10% filtrierter Isopropylalkohollösung pH 8,6 ; Pellet bei 70% Sättigung besitzt die höchste spezifische Aktivität und wird weiterverwendet.

3. Schritt: Ionenchromatographie an DEAE-Zellulose DE-52

4. Schritt: Gelfiltration mit Sephadex G-200

Es wird eine 180-fach höhere spezifische Aktivität gegenüber einer AP-Extraktion mit aqua dest. erreicht.

Mit dem gereinigten Enzym werden vier Kaninchen immunisiert.

Die nach ca 50 Tagen gewonnenen Antiseren reagieren in der Agargel-Präzipitation nach Ouchterlony mit dem verwendeten Antigen, einem Butanol-Extrakt aus Leber, mit Patientenserum, jedoch nicht mit einem Butanol-Extrakt aus Knochen. Die Antigen-Antikörper-Komplexe zeigen AP-Aktivität.

Nach 70 Tagen gewonnenes Antiserum zeigt bei der Immuntitration die grundsätzliche Möglichkeit, die Organzugehörigkeit der AP zu differenzieren, da bei Titerstufen um 1:64 und 1:128 eine selektive Hemmung der Leberphosphatase auftritt. Die bei niedrigeren Titerstufen gefundene Hemmung des Knochenenzym lässt sich durch Absorption des Antiserums mit Butanol-Extrakt aus Knochen beseitigen, ohne Beeinträchtigung der Hemmwirkung auf die Leberphosphatase.

Zu besonderem Dank bin ich verpflichtet dem Direktor des Klinisch-Chemischen Institutes des Krankenhauses München-Schwabing Prof. Dr. O. Wieland, der mir die Anregung zu dieser Arbeit gab und ihre Entstehung großzügig und mit wertvollem Rat unterstützte.

Ebenfalls besonders danken möchte ich Frl. Dr. R. Dolhofer, die durch ständige Beratung und Hilfe meine Arbeit wesentlich gefördert hat.

Für Ratschläge und technische Hilfen geht mein Dank an Herrn Dr. K. Gerbitz, Herrn PD Dr. L. Weiss, Herrn Dr. Siess, Herrn Dr. Kolb und Frl. M. Schleithoff.

Den Mitarbeitern des Pathologischen Instituts des Krankenhauses München-Schwabing sei an dieser Stelle ebenfalls herzlich gedankt für ihre freundliche Unterstützung und Beratung bei Beschaffung und Auswahl der Gewebeproben.

7. L i t e r a t u r e:

1. Ackerman, G.A. :
Substituted naphthol AS phosphate derivatives for the
localization of leukocyte alkaline phosphatase.
Lab. Invest.(1962) 11, 563
2. Ahlers, J. :
Kinetics of alkaline phosphatase from pig kidney.
Biochem. J.(1974) 141, 257
3. Ahmed, Z. and King, E.J. :
Purification of placental alkaline phosphatase.
Biochim. Biophys. Acta (1960) 40, 320
4. Aleem, F.A. :
Total and heat - stable serum alkaline phosphatase
in normal and abnormal pregnancies.
Obstetrics and Gynecology (1972) 40, 163
5. Balant, L., J. Fabre, A. Jung et C.A.Rosenbusch :
Les isoenzymes de la phosphatase alcaline.
Schweiz. med. Wschr. (1975) 105, 601
6. Bessey, O.A., O. Lowry, M.J. Brock :
A method for the rapid determination of alkaline
phosphatase with five cubic millimeters of serum.
J. biol. Chem. (1946) 164, 321
7. Boyer, S.H. :
Human organ alkaline phosphatases : Discrimination
by several means including starch-gel electropho-
resis of antienzyme-enzyme supernatant fluids.
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963) 103, 938
8. Brenna, O., P. Perella, M. Pace and P.G. Pietta :
Affinity-chromatography purification of alkaline
phosphatase from calf intestine.
Biochem. J. (1975) 151, 291

9. Broe de, M.E., M. Borgers and R.J. Nieme :
The separation and characterization of liver plasma
membrane fragments circulating in the blood of
patients with cholestasis.
Clin. Chim. Acta (1975) 59, 369

10. Brojer, B. and D.W. Moss :
Changes in the alkaline phosphatase activity of
serum samples after thawing and after reconstitution
from the lyophilized state.
Clin. Chim. Acta (1971) 35, 511

11. Canapa-Anson, R. and D.J.F. Rowe :
Electrophoretic separation of tissue specific
serum alkaline phosphatases.
J. Clin. Pathol. (1970) 23, 499

12. Chiandussi, L., S.F. Greene and S. Sherlock :
Serum alkaline phosphatase fractions in hepato-
biliary and bone diseases.
Clin. Sci. (1962) 22, 425

13. Cooke, K.B. and J.F. Silva :
Serum alkaline phosphatase fractionation as an
aid to diagnosis.
J. Clin. Pathol. (1961) 14, 500

14. Doellgast, G.J. and W.H. Fishman :
Purification of human placental alkaline phosphatase.
Biochem. J. (1974) 141, 103

15. Dymling, J.-F. :
Separation of serum and placental alkaline phosphatase by agarose gel electrophoresis and sephadex chromatography.
Scand. J. clin. Lab. Invest. (1966) 18, 129

16. Engström, L. :
Studies on bovine-liver alkaline phosphatase,
purification, phosphate incorporation.
Biochim. Biophys. Acta (1964) 92, 71
17. Estborn, B. :
Separation of phosphatase iso-enzymes by gel-
filtration.
Z. klin. Chem. (1964) 2, 53
18. Felix, R. and H. Fleisch :
The pyrophosphatase and ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$) - ATPase
activity of purified calf bone alkaline phosphatase.
Biochim. Biophys. Acta (1974) 350, 84
19. Fenelly, J.J., M.X. Fitzgerald, K. McGeeney :
Value of differential thermostability, urea inhi-
bition, and gel filtration of alkaline phosphatase
in the identification of disease states.
Gut (1969) 10, 45
20. Fishman, W.J., S. Green, N.I. Inglis :
Organ-specific behavior exhibited by rat intestine
and liver alkaline phosphatase.
Biochim. Biophys. Acta (1962) 62, 363
21. Fishman, W.J., S. Green, N.I. Inglis :
L-phenylalanine: an organic specific, stereospecific
inhibitor of human intestinal alkaline phosphatase.
Nature (1963) 198, 685
22. Fishman, W.H. and N.K. Ghosh :
Isoenzymes of human alkaline phosphatase.
Advan. Clin. Chem. (1967) 10, 255

23. Fishman, W.H.:
Immunologic and biochemical approaches to alkaline phosphatase isoenzyme analysis: the Regan isoenzyme.
Ann. N. Y. Sci. (1969) 166, 745
24. Fishman, W.H., N.R. Inglis and S. Green:
Regan isoenzyme: a carcino-placental antigen.
Cancer Research (1971) 31, 1054
25. Fishman, L., N.R. Inglis and W.H. Fishman:
Preparation of two antigens of human liver isoenzymes of alkaline phosphatase.
Clin. Chim. Acta (1971) 34, 393
26. Fishman, H.W., W.A. Bardawil, H.G. Habib, C.L. Anstiss and S. Green:
The placental isoenzyme of alkaline phosphatase in sera of normal pregnancy.
Am. J. Clin. Path. (1972) 57, 65
27. Fitzgerald, M.X., J.J. Fennelly and K. McGeeney:
The value of differential alkaline phosphatase thermostability in clinical diagnosis.
Am. J. Clin. Path. (1969) 51, 194
28. Fritsche, H.A., J. and H.R. Adams - Park:
Cellulose acetate electrophoresis of alkaline phosphatase isoenzymes in human serum and tissue.
Clin. Chem. (1972) 18, 417
29. Gerlach, U., W. Paul, L. Hiby:
Über den diagnostischen Wert der Bestimmung von Isoenzymen der alkalischen Phosphatase im Serum.
Med. Welt (1970) 21, 1252

30. Green, S., F. Cantor, N.R. Inglis and W.H. Fishman:
Normal serum alkaline phosphatase isoenzymes
examined by acrylamide and starch gel electrophoresis
and by isoenzyme analysis using organ-specific
inhibitors.
Am. J. Clin. Path. (1971) 57, 52
31. Haije, W.H., M. Dejong:
Isoenzyme patterns of serum alkaline phosphatase in
agar-gel electrophoresis and their clinical signi-
ficance.
Clin. Chim. Acta (1963) 8, 620
32. Harkness, D.R.:
Studies on human placental alkaline phosphatase
I. Purification and Crystallization.
Arch. Biochem. Biophys. (1968) 126, 503
33. Harkness, D.R.:
Studies on human placental alkaline phosphatase
II. Kinetic properties and studies on the apoenzyme.
Arch. Biochem. Biophys. (1968) 126, 513
34. Kazuya, H., S. Kudo, Y. Yamamura, T. Honda, J. Sakurai:
Possible identity between the hepatoma alkaline
phosphatase and an isoenzyme of human amniotic
membrane (FL cells).
Clin. Chim. Acta (1975) 60, 267
35. Hiwada, K. and E.D. Wachsmuth:
Catalytic properties of alkaline phosphatase from
pig kidney.
Biochem. J. (1974) 141, 283
36. Hodson, A.W. and A.L. Latner:
Alkaline phosphatase isoenzymes of human kidney
and urin.
Clin. Chim. Acta (1975) 61, 53

37. Horder, L.:
The inorganic pyrophosphatase activity associated
with forms of alkaline phosphatases isolated from
human serum.
Clin. Chim. Acta (1973) 49, 383

38. Husen, van N. und U. Gerlach:
Über die Aktivitätserhöhung der unspezifisch Lipo-
protein-gebundenen alkalischen Phosphatase im
menschlichen Serum.
Clin. Chim. Acta (1974) 53, 91

39. Kaplan, M.M. and L. Rogers:
Separation of human serum alkaline phosphatase
isoenzymes by polyacrylamide gel electrophoresis.
Lancet ii (1969) 1029

40. Keiding, N.R.:
Differentiation into three fractions of serum alkaline
phosphatase and the behaviour of the fractions in
diseases of bone and liver.
Scand. J. clin. Lab. Invest. (1959) 11, 106

41. Keiding, N.R.:
Intestinal alkaline phosphatase in human lymph
and serum.
Scand. J. clin. Lab. Invest. (1966) 18, 134

42. Keiding, N.R.:
Phosphatase isoenzymes in human serum.
Scand. J. clin. Lab. Invest. (1974) 33, 1

43. King, E.J.:
Properties of alkaline phosphatase fractions sepa-
rated by starch-gel electrophoresis.
Biochem. J. (1962) 84, 192

44. Klein, U.E.:
Isoenzyme der alkalischen Phosphatase.
Dtsch. med. Wschr. (1969) 11, 526
45. Korner, N.H.:
Distribution of alkaline phosphatase in serum
protein fractions.
J. clin. Path. (1962) 15, 195
46. Kreisher, J.H., V.A. Close and W.H. Fishman:
Identification by means of l-phenylalanin inhibition
of intestinal alkaline phosphatase components
separated by starch gel electrophoresis of serum.
Clin. Chim. Acta (1965) 11, 122
47. Maruna, R.F.L.:
Isoenzyme von Phosphomonoesterasen in Körperflüssig-
keiten und Geweben. Untersuchungen von Sauren und
Alkalischen Phosphatasen im Harn.
Clin. Chim. Acta (1969) 25, 133
48. Mather, J.H. and T.W. Keenan:
The stability of alkaline phosphatase in sodium
dodecyl sulfate.
FEBS Letters (1974) 44, 79
49. Morton, R.K.:
The purification of alkaline phosphatases of
animal tissues.
Biochem. J. (1954) 57, 595
50. Moss, D.W., D.M. Campell, E. Anagnostou-Kakaras
and E.J. King:
Characterization of tissue alkaline phosphatase and
their partial purification by starch gel electrophoresis.
Biochem. J. (1961) 81, 441

- 51.. Moss, D.W.:
Properties of alkaline phosphatase fractions in
extracts of human small intestine.
Biochem. J. (1965) 94, 458
52. Moss, D.W., R.J. Eaton, J.K. Smith and L.G. Whitby:
Association of inorganic-pyrophosphatase activity
with human alkaline phosphatase preparations.
Biochem. J. (1967) 102, 53
53. Moss, D.W. and L.G. Whitby:
A simplified heat-inactivation method for investi-
gating alkaline phosphatase isoenzymes in serum.
Clin. Chim. Acta (1975) 61, 63
54. Nath, R.L. and N.K. Gosh:
Studies on serum phosphatases: Effect of dilution
on acid and alkaline phosphatases of human serum.
Enzymologica (1963) 25, 182
55. Nayudu, P.R.V., and F.B. Hercus:
Molecular Heterogeneity of mouse duodenal
alkaline phosphatase.
Biochem. J. (1974) 141, 93
56. Neale, F.C., J.S. Clubb, D. Hotchkis, S. Posen:
Heat stability of human placental alkaline phosphatase.
J. clin. Path. (1965) 18, 359
57. Nordentoft-Jensen, B.:
Differentiation between the electrophoretic pattern
of serum alkaline phosphatase in bone disease and
in liver disease.
Clin. Sci. (1964) 26, 299
58. Nordentoft-Jensen, B.:
The fast-moving fraction of serum alkaline phosphatase in patients with various diseases.
Dan. med. Bull. (1966) 13, 175

59. Ohlen, J., H. Ley:
Vergleichende Aktivitätsbestimmungen der alkalischen
Phosphatase in Serum, Gallenblasengalle und
Choledochusgalle.
Klin. Wschr. (1970) 48, 1056

60. Ohlen, J., H. Pause and J. Richter:
Alkaline phosphatase: Diagnostic value of iso-
enzyme determination.
Europ. J. clin. Invest. (1971) 1, 445

61. Ornstein, L.:
Disc electrophoresis .Background and theory.
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1964) 121, 321

62. Posen, S., F.C. Neale, J.S. Clubb:
Heat inactivation in the study of human alkaline
phosphatase.
Ann. intern. Med. (1965) 62, 1234

63. Posen, S.:
Alkaline phosphatase, a review.
Ann. intern. Med. (1967) 67, 183

64. Rhone, D.P. and F.M. Mizuno:
Separation of isoenzymes of alkaline phosphatase by
substrate-gel imprint after electrophoresis on
cellulose acetate.
Clin. Chem. (1972) 18, 662

65. Rhone, D.P. and F.M. Mizuno:
Profiles of alkaline phosphatase isoenzymes in serum
using cellulose acetate electrophoresis and organ-
specific inhibitors.
Amer. J. Clin. Path. (1973) 59, 531

66. Rhone, D.L., F.M. White and H. Gidaszow:
Isoenzymes of liver alkaline phosphatase in serum
of patients with hepatobiliary disorders.
Clin. Chem. (1973) 19, 1142

67. Romel, W., S. la Mancusa and J. DuFrene:
Detection of serum alkaline phosphatase isoenzymes
with phenolphthalein monophosphate following cellulose acetate electrophoresis.
Clin. Chem. (1968) 14, 47

68. Rosenberg, I.N.:
Zone electrophoretic studies of serum alkaline phosphatase.
J. clin. Invest. (1959) 38, 630

69. Saini, P.K. and S. Posen:
The origin of serum alkaline phosphatase in the rat.
Biochim. Biophys. Acta (1969) 177, 42

70. Sasse, U.:
Alkalische Phosphatase - Kinetische Bestimmung
Probleme der Qualitätskontrolle.
Ärztl. Lab. (1972) 18, 271

71. Schlaeger, R.:
The mechanism of the increase in the activity of liver alkaline phosphatase in experimental cholestasis:
Measurement of an increased enzyme concentration by immunochemical titration.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. (1975) 13, 277

72. Schlamowitz, M.:
Immunochemical studies on alkaline phosphatase.
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1958) 75, 373

73. Semb, T.H., C.R. Gudmundson, N.E. Westlin and L.B. Hallander:
Alkaline phosphatase activity and isoenzymes in experimental fractures.
Clin. Chim. Acta (1971) 31, 375
74. Smith, I., P. Lightstone and J. Perry:
Separation of human tissue alkaline phosphatases by electrophoresis on acrylamide disc gels.
Clin. Chim. Acta (1968) 19, 499
75. Stevenson, D.E.:
Demonstration of alkaline phosphatase activity following agar-gel electrophoresis.
Clin. Chim. Acta (1961) 6, 142
76. Stolbach, L.L.:
Clinical application of alkaline phosphatase isoenzyme analysis.
Ann. N. Y. Acad. Sci. (1969) 166, 760
77. Sussman, H.H., P. A. Small and E. Cotlove:
Human alkaline phosphatase: Immunochemical identification of organ-specific isoenzymes.
J. biol. Chem. (1968) 243, 160
78. Sussman, H.H. and A.J. Gottlieb:
Human placental alkaline phosphatase: II. Molecular and subunit properties of the enzyme.
Biochim. Biophys. Acta (1969) 194, 170
77. Sussman, H.H.:
Source of the increased serum alkaline phosphatase activity in Paget's disease.
Clin. Chim. Acta (1970) 27, 171

80. Taswell, H.F. and D.M. Jeffers:
Isoenzymes of serum alkaline phosphatase in hepato-
biliary and skeletal disease.
Amer. J. Clin. Path. (1963) 40, 349
81. Usategui-Gomez, M. and F.M. Yeager:
The use of polymerized antisera for the determination
of human placental alkaline phosphatase in preg-
nancy sera.
Clin. Chim. Acta (1973) 46, 355
82. Wachsmuth, E.D. and K. Hiwada:
Alkaline phosphatase from pig kidney. Method of
purification and molecular properties.
Biochem. J. (1974) 141, 273
83. Walker, A.W. and A.C. Pollard:
Observations on serum alkaline phosphatase eletro-
phoretic patterns on polyacrylamid gel with parti-
cular reference to the effects of butanol extraction.
Clin. Chim. Acta (1971) 34, 19
84. Weber, K. and M. Osborn:
The reliability of molecular weight determination
by dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis.
J. biol. Chem. (1969) 244, 4406
85. Whitby, L.G. and D.W. Moss:
Analysis of heat inactivation curves of alkaline
phosphatase isoenzymes in serum.
Clin. Chim. Acta (1975) 59, 361
86. Wolf, M., A. Dinwoodie and H.G. Mogan:
Comparison of alkaline phosphatase isoenzymes activity
using five standard methods.
Clin. Chim. Acta (1969) 24, 131

87. Yong, I.M.:
Origins of serum alkaline phosphatase.
J. clin. Path. (1967) 20, 647

Lebenslauf

Günther Lehmeier, geb. am 16.2.1949 in Amberg

Vater: Alois Lehmeier

Mutter: Martha Lehmeier, geb. Feierabend

Sept. 1955: Eintritt in die Volksschule Amberg

Sept. 1960: Übertritt in die damalige Oberrealschule
Amberg - neusprachlicher Ausbildungsweg

Juli 1969: Abitur an diesem Gymnasium

Wintersemester 1969/70: Studienbeginn: Mathematik und
Physik an der Universität München

Sommersemester 1970: Beginn des Studiums an der Med. Fak.
Universität München

Wintersemester 1970/71: nat.-wiss.-Vorprüfung

Sommersemester 1972: ärztliche Vorprüfung

April 1973 - April 1974: Wochenend- und Nachtdienst im
Notfall-Labor des Klin.-Chem.-
Institutes des Kkh. Mü.-Schwabing

Jan. 1974: Beginn der experiment. Arbeit der Dissertation

Sept. - Dez. 1975: ärztliche Prüfung an der Universität
München

April - Juli 1976: Med.-Ass. an der chir.Abt. Kkh. Mü-
Neuperlach

Seit Sept.1976: Med.-Ass. an der gyn. Privatklinik Dr.
Geisenhofer München

